

SKRIPSI

PENENTUAN KADAR (-)-EPIGALOKATEKIN GALAT (EGCG) DALAM PRODUK TEH HIJAU CELUP DAN PRODUK TEH HITAM CELUP PADA PENYEDUHAN BERULANG DENGAN METODE KCKT



NI MADE RATIH SUANDARI

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2016**

SKRIPSI

PENENTUAN KADAR (-)-EPIGALOKATEKIN GALAT (EGCG) DALAM PRODUK TEH HIJAU CELUP DAN PRODUK TEH HITAM CELUP PADA PENYEDUHAN BERULANG DENGAN METODE KCKT



**NI MADE RATIH SUANDARI
(051211133011)**

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2016**

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Untuk perkembangan dunia ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya, dengan judul:

**PENENTUAN KADAR (-)-EPIGALOKATEKIN GALAT (EGCG)
DALAM PRODUK TEH HIJAU CELUP DAN PRODUK TEH
HITAM CELUP PADA PENYEDUHAN BERULANG DENGAN
METODE KCKT**

Untuk dipublikasikan dan ditampilkan pada internet atau media lain yaitu digital library perpustakaan universitas airlangga untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan undang-undang hak cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Sacabaya, Agustus 2016

**WISATA
TEKNIK**

8200040F798BQ5352

6000
PENGUNTAHAN

Ni Made Ratih Suandari

NIM:051211133011

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ni Made Ratih Suandari

NIM : 051211133011

Fakultas : Farmasi

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir yang saya tulis dengan judul;

**PENENTUAN KADAR (-)-EPIGALOKATEKIN GALAT (EGCG)
DALAM PRODUK TEH HIJAU CELUP DAN PRODUK TEH
HITAM CELUP PADA PENYEDUHAN BERULANG DENGAN
METODE KCKT**

Adalah benar-benar hasil dari karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi ini merupakan hasil plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, Agustus 2016



Ni Made Ratih Suandari

NIM:051211133011



KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas segala berkat dan karunia-Nya skripsi yang berjudul

“PENENTUAN KADAR (-)EPIGALOKATEKIN GALAT (EGCG) DALAM PRODUK TEH HIJAU CELUP DAN PRODUK TEH HITAM CELUP PADA PENYEDUHAN BERULANG DENGAN METODE KCKT” ini dapat saya selesaikan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Pada kesempatan ini, perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian skripsi ini, yaitu:

1. Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto., M.Si., Apt. selaku pembimbing utama dan Prof. Dr. Sudjarwo., M.S., Apt. selaku pembimbing serta atas segala waktu, kesabaran, nasehat, bimbingan serta masukan selama penulis menyelesaikan skripsi ini.
2. Drs.Hadi Poerwono, Msc., Apt., PhD., dan Drs. Robby Sondakh., M.S., Apt. Selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan untuk penyempurnaan naskah ini.
3. Keluarga tecinta, ayah I Made Suanda dan ibu Luh Suratni, yang telah memberikan kasih sayang, semangat, dan doa yang tiada hentinya serta kakak saya Putu Survina Kumidayatni Darnanda, Putra Ananjaya, dan adik saya I Nyoman Aditya Mas Pramana yang telah memberikan semangat dan motivasi.

4. Dra. Rakhmawati, M.Si., Apt selaku dosen wali dan para dosen yang telah memberikan perhatian, saran, dan dukungan selama saya menjalani studi di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
5. Dr. Umi Athijah, M.S., Apt selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program sarjana di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
6. Seluruh tenaga non kependidikan terutama tenaga non kependidikan laboratorium Kimia Farmasi (Bapak Kusairi, Bapak Dasuki, Mas Kustiawan) yang telah membantu penulis saat mengerjakan penelitian ini.
7. Tim "*Green tea project*" (Mia, Frenby, Acan, Dimas, Safa, Mas Lutfi) yang telah bersama-sama berjuang untuk menuntaskan skripsi ini.
8. Teman-teman skripsi Departemen Kimia Farmasi (Prima, Komang, Yayat, Hadi, Tika, Ririz, Indah dan lain-lain) yang telah membantu dan memberikan dukungan serta motivasi.
9. Sahabat saya (Diyan, Listya, Mangtry, Gekmas, Anom, Uthi, Yanti, Desy, Nanda, Ratih, Candra, Intan, Amel, Daniar, Enggar, Farah, Alifia, Anggana, Nabilla, Rahma, Winda, Yunita, Ariani, Amani) yang selalu memberikan semangat dan motivasi untuk menyelesaikan skripsi ini.
10. Teman-teman Amoksilin Kelas A dan teman-teman angkatan 2012 Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas kebersamaan dan dukungannya.
11. Teman-teman, Kakak-kakak, dan Adik-adik DKH Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Saya menyadari masih banyak kekurangan dalam menyusun naskah ini. Segala bentuk saran dan kritik saya harapkan dalam upaya menyempurnakan naskah ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang kefarmasian.



Surabaya, Agustus 2016

Penulis

RINGKASAN

PENENTUAN KADAR (-) EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG) DALAM PRODUK TEH HIJAU CELUP DAN PRODUK TEH HITAM CELUP PADA PENYEDUHAN BERULANG DENGAN METODE KCKT

Ni Made Ratih Suandari

Teh merupakan salah satu minuman terpopuler yang dikonsumsi oleh masyarakat di seluruh dunia. Teh berasal dari tanaman *Camellia sinensis*, yang dikonsumsi dalam bentuk teh hijau, teh hitam, atau teh oolong (Chacko *et al.*, 2010). Teh memiliki banyak manfaat bagi kesehatan yaitu untuk mencegah kanker, dan penyakit kardiovaskular, sebagai anti inflamasi, anti bakteri, anti virus, dan memiliki efek untuk menurunkan kadar kolesterol dalam tubuh (Chacko *et al.*, 2010). Manfaat kesehatan yang didapat dari teh sebagian besar disebabkan karena adanya polifenol (Taylerson, 2015).

EGCG merupakan kandungan polifenol utama dan yang paling spesifik yang terdapat didalam teh terutama teh hijau serta memiliki peran sebagai antioksidan, antiinflamasi, antiaterogenik, dan dapat mendegradasi proteasome (Mereles *et al.*, 2011). Melihat banyaknya manfaat yang didapat dari EGCG, dan banyaknya minat masyarakat dalam mengkonsumsi teh sehingga dilakukan penelitian penentuan kadar EGCG pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang diseduh berulang hingga seduhan ketiga.

Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar, optimasi kondisi KCKT, validasi metode, dan penetapan kadar EGCG pada sampel. Hasil dari penetapan kadar air pada produk teh hijau celup 7,5199% dan pada produk teh hitam celup sebesar 7,1418 %. Produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup dipreparasi terlebih dahulu dengan cara mengekstraksi dengan kloroform dan etil asetat, kemudian etil asetat diuapkan hingga kering, lalu dilarutkan dalam metanol yang kemudian disuntikkan pada KCKT. Kondisi KCKT yang terpilih adalah dengan fase gerak metanol : air : asam asetat 2% v/v dengan perbandingan 20 : 75 : 5 v/v/v secara isokratik dengan pH fase gerak 4. Kolom yang digunakan adalah RP C-18 mikro bondapack 10mikrom, 3,9x300 mm, dengan laju alir 1 ml/menit. Detektor yang digunakan adalah spektrofotometer diode array dan panjang gelombang 274,0 nm. Pada penelitian ini dilakukan validasi metode, diantaranya selektivitas, akurasi, linieritas, presisi, batas deteksi dan

kuantitasi, dan hasil dari validasi metode yang dilakukan telah memenuhi syarat.

Penetapan kadar EGCG dari sampel dilakukan setelah validasi metode memenuhi persyaratan. Pada penetapan kadar EGCG, kandungan EGCG terbesar ada pada penyeduhan dengan waktu 20 menit, kemudian waktu 10 menit, diikuti dengan seduhan pertama. Kadar EGCG pada teh hijau celup pada seduhan pertama 0,65% (b/b) kedua 0,15 % (b/b) dan pada seduhan ketiga sebesar 0,06% (b/b). Kadar EGCG pada teh hitam celup pada seduhan pertama 0,52 % (b/b) kedua 0,07 % (b/b).



ABSTRACT**DETERMINATION OF EGCG IN GREEN TEA AND BLACK TEA THAT REPEATEDLY BREWED USING HPLC**

Ni Made Ratih Suandari

Many varieties of tea from the plant *Camellia sinensis* have been consumed for around 50 centuries and today are popular beverage worldwide. EGCG is the most abundant, potent polyphenol in tea. It has various medicinal potentialities as antioxidant, antimicrobial, anti-cardiovascular and anti-hypertensive activity. The purpose of this study was to determine the differences of EGCG concentration in green tea and black tea that were brewed repeatedly using HPLC with RP C-18 Mikrobondapack coloumn 10, 3.9x300 mm. Methanol : water : acetic acid 2 % v/v (20:75:5) as mobile phase, the flow rate was 1.0 ml/minute and detection at 274.0 nm. The method was validated for selectivity, accuracy, linearity, precision, limit of detection and limit of quatitation. From this study, we can conclude that there are difference concentration of EGCG in differents time brewing. The concentration of EGCG in green tea were $1.37 \pm 0.04\%$ that brewed for 20 minutes ; $0.99 \pm 0.13\%$ that brewed for 10 minutes. For repeated green tea brewing, the concentration of EGCG $0.65 \pm 0.25\%$ for first brew; $0.15 \pm 0.04\%$ for second brew, $0.06 \pm 0.00\%$ for third brew. On other hand, The concentration of EGCG in black tea were $0.79 \pm 0.17 \%$ that brewed for 20 minutes ; $0.65 \pm 0.25\%$ that brewed for 10 minutes. For repeated black tea brewing, the concentration of EGCG $0.52 \pm 0.02\%$ for first brew; $0.07 \pm 0.02\%$ for second brew, $0.06 \pm 0.00\%$ for third brew.

Keyword : Black tea, Green tea, Epigallocatechin gallate (EGCG), HPLC

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	iii
SURAT PERNYATAAN	iv
LEMBAR PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
RINGKASAN	ix
ABSTRACT	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Manfaat Penelitian	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Tinjauan tentang teh	8
2.1.1. Jenis dan karakteristik teh	8
2.1.1.1. Teh Hijau	8
2.1.1.2 Teh Hitam	9
2.1.1.3 Teh Putih	10
2.1.1.4 Teh Oolong	11
2.1.1.5 Teh Pu-erh	12
2.1.2 Kandungan Teh	13
2.1.3 Manfaat Teh	14

2.2 Tinjauan Tentang EGCG.....	15
2.3. Tinjauan Tentang KCKT.....	16
2.3.1. Mekanisme KCKT.....	17
2.3.2 Tipe KCKT	17
2.3.2.1 KCKT Fase Normal	18
2.3.2.2 KCKT Fase Terbalik.....	18
2.3.2.3 KCKT Penukar Ion	18
2.3.3 Komponen KCKT.....	18
2.3.4. Parameter Kromatografi	20
2.3.4.1. Faktor Retensi (k')	20
2.3.4.2. Resolusi.....	20
2.3.4.3. Faktor Selektivitas.....	21
2.3.5 Parameter Validasi.....	21
2.3.5.1 Spesifitas	22
2.3.5.2 Linearitas.....	23
2.3.5.3 Presisi.....	23
2.3.5.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	23
2.3.5.5 Akurasi.....	24
2.4 Tinjauan Tentang Ekstraksi.....	25
2.4.1. Maserasi.....	25
2.4.2. Sokletasi.....	25
2.4.3. Perkolasi	26
2.4.4. Infusi.....	26
2.4.4. Reflux	26
2.4.4. Sonikasi (Ekstraksi Ultrasound)	26
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL.....	27
3.1. Kerangka Konseptual	28

3.2. Bagan Kerangka Konseptual	29
3.3. Hipotesa	30
BAB IV. METODE PENELITIAN	31
4.1. Alat	31
4.2. Bahan	31
4.3. Variabel Penelitian	31
4.4. Definisi Operasional	31
4.5. Metode Penelitian	32
4.5.1. Penetapan Kadar Air	32
4.5.2. Ekstraksi EGCG Dari Produk Teh Hijau Celup dan Produk Teh Hitam Celup	32
4.5.3. Penyederhanaan Matriks	34
4.5.4. Penentuan Panjang Gelombang	35
4.5.5. Optimasi fase gerak	35
4.5.6. Spesifisitas	35
4.5.7. Linearitas	36
4.5.8. Penetapan Batas Deteksi dan batas Kuantitasi	36
4.5.9. Presisi	37
4.5.10. Akurasi dan Presisi Metode	37
4.5.11. Penetapan Kadar EGCG	38
BAB V. HASIL PENELITIAN	39
5.1. Penetapan Air	39
5.2. Optimasi Kondisi KCKT	40
5.2.1. Penentuan Panjang Gelombang Terpilih	40
5.2.2. Kondisi KCKT	41
5.3. METODE VALIDASI	42
5.3.1. Penentuan Spesifisitas	42

5.3.2. Penentuan Linieritas	43
5.3.3. Penentuan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)	45
5.3.4. Penentuan Presisi	46
5.3.5. Penentuan Akurasi	47
5.5. Penetapan Kadar	50
5.6. Analisis Statistika	56
BAB VI. PEMBAHASAN	59
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	67
7.1. Kesimpulan	67
7.2. Saran	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN	72

DAFTAR TABEL

Tabel II.1	Komposisi teh hijau dan teh hitam	14
Tabel II.2.	Elemen data yang dibutuhkan untuk validasi	22
Tabel V.1	Kadar air pada produk teh hijau celup	39
Tabel V.2	Kadar air pada produk teh hitam celup	40
Tabel V.3	Kondisi KCKT terpilih.....	41
Tabel V.4	Linearitas standar EGCG	44
Tabel V.5	Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	45
Tabel V.6	Presisi <i>intraday</i>	46
Tabel V.7	Presisi <i>interday</i>	47
Tabel V.8	Akurasi EGCG pada produk teh hijau celup	48
Tabel V.9	Akurasi EGCG pada produk teh hitam celup	49
V.10	Pengaruh waktu penyeduhan terhadap kadar EGCG pada produk teh hijau celup	50
Tabel V.11	Pengaruh penyeduhan berulang terhadap kadar EGCG pada produk teh hijau celup.....	52
Tabel V.12	Pengaruh waktu penyeduhan terhadap kadar EGCG pada produk teh hitam celup	53
Tabel V.13	Pengaruh penyeduhan berulang terhadap kadar EGCG pada produk teh hitam celup.....	55
Tabel V.14	Analisis anova satu arah pada produk teh hijau celup...56	
Tabel V.15	Analisis anova satu arah pada produk teh hitam celup..57	

DAFTAR GAMBAR

Gb. 2.1	Daun Teh <i>Camellia sinensis</i>	8
Gb. 2.2	Struktur Kimia epigallocatechin gallate	15
Gb. 2.3	Komponen KCKT	18
Gb. 5.1	Spektra larutan standar EGCG 20,0 ppm dan 40,0 ppm dalam pelarut metanol.....	41
Gb. 5.2	Kromatogram metanol. Standar EGCG 40,0 ppm sampel produk teh hijau celup, sampel produk teh hijau celup yang dadisi dengan standar EGCG 70,0 mg	42
Gb. 5.3	Kromatogram metanol. Standar EGCG 40,0 ppm sampel produk teh hitam celup, sampel produk teh hitam celup yang dadisi dengan standar EGCG 10,0 mg	43
Gb. 5.4	Linearitas standar EGCG	44
Gb. 5.5	Linearitas standar EGCG	45
Gb. 5.6	Diagram batang pengaruh waktu penyeduhan terhadap kadar EGCG pada produk teh hijau celup	51
Gb. 5.7	Penentuan kadar EGCG pada penyeduhan berulang produk teh hijau celup.....	52
Gb. 5.8	Diagram batang pengaruh waktu penyeduhan terhadap kadar EGCG pada produk teh hitam celup	54
Gb. 5.9	Penentuan kadar EGCG pada penyeduhan berulang produk teh hitam celup.....	55

DAFTAR SINGKATAN

<i>EC</i>	= (-)- <i>epicatechin</i>
<i>ECG</i>	= (-)- <i>epicatechin-3-gallate</i>
<i>EGC</i>	= (-)- <i>epigallo-catechin</i>
<i>EGCG</i>	= (-)- <i>epigallocatechin-3-gallate</i>
KCKT	= Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
LOD	= <i>Limit of Detection</i> (Batas Deteksi)
LOQ	= <i>Limit of Quantitation</i> (Batas Kuantitasi)



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Teh merupakan salah satu minuman populer yang dikonsumsi oleh masyarakat di seluruh dunia. Teh berasal dari tanaman *Camellia sinensis*, yang dikonsumsi dalam bentuk teh hijau, teh hitam, atau teh oolong (Chacko *et al.*, 2010). Jumlah total teh yang diproduksi dan dikonsumsi diseluruh dunia sebanyak 78% merupakan teh hitam, sebanyak 20% merupakan teh hijau dan kurang dari 2% merupakan teh oolong. Negara yang mengkonsumsi teh hitam pada umumnya negara yang berada di belahan bumi bagian barat dan beberapa negara asia, sedangkan teh hijau umumnya dikonsumsi oleh negara Cina, Jepang, India, dan beberapa negara yang ada di Afrika Utara serta negara Timur Tengah (Cathurvedula *et al.*, 2011). Di dalam negeri, teh dikonsumsi dalam bentuk minuman. Berbagai produk teh yang telah dikembangkan secara luas adalah teh celup. Sediaan teh jenis ini digemari oleh masyarakat karena praktis dalam penyiapannya (Martono, 2012).

Kualitas teh dapat dilihat dari penampilan teh yang meliputi aroma, warna, dan rasanya. Aroma dan rasa dari teh tergantung pada banyak faktor, seperti tempat produksi, waktu pemetikan daun teh, proses produksi dan kondisi penyimpanannya, sehingga sulit untuk mempertahankan konsistensi teh agar memiliki kualitas yang tinggi (Shidong *et al.*, 2014). Sejak dahulu, teh dianggap sebagai obat dan minuman kesehatan. Teh semakin populer karena efek antioksidan yang dimiliki (Saito *et al.*, 2006).

Jenis teh dibedakan berdasarkan proses pembuatannya. Untuk memproduksi teh hijau daun teh yang baru dipetik langsung diuapkan untuk

mencegah terjadinya fermentasi sehingga dihasilkan produk yang kering dan stabil (Chacko *et al.*, 2010). Teh hitam diproduksi dari pucuk daun yang pertama dan kedua dari pucuk, yang selanjutnya dikeringkan (Bhattacharyya *et al.*, 2007). Daun teh yang sudah dikeringkan selanjutnya difermentasi yang menyebabkan daun teh mengalami oksidasi, sehingga warna daun teh menjadi coklat (Bhattacharyya *et al.*, 2007). Teh mengandung lebih dari 4000 senyawa aktif yang sepertiganya merupakan polifenol. Senyawa lain yang terdapat didalam teh adalah alkaloid (kafein, teofilin, teobromin), asam amino, karbohidrat, protein, klorofil, senyawa yang mudah menguap yang memberikan aroma pada teh seperti florida, aluminium, dan mineral (Namita *et al.*, 2012).

Manfaat kesehatan yang didapat dari teh sebagian besar disebabkan karena adanya polifenol. Polifenol terdapat di semua jenis teh, namun karena pengolahan yang berbeda menyebabkan jumlah polifenol yang terkandung didalam teh juga berbeda (Taylerson, 2012). Polifenol yang terdapat dalam teh memberikan aktivitas antioksidan yang dapat digunakan untuk mencegah penyakit kardiovaskular, kanker, inflamasi, dan diabetes. Selama ini para peneliti memfokuskan untuk menentukan jumlah kandungan polifenol dalam teh hitam dan teh hijau, dimungkinkan karena jumlah terbesar teh yang dikonsumsi adalah teh hitam (78%) dan teh hijau (20%) (Tepphakorn *et al.*, 2013).

Jumlah polifenol yang terkandung di dalam daun teh terhitung sebesar 30% dalam berat keringnya. Polifenol yang terkandung di dalam teh hijau sebagian besar merupakan catechin. Di dalam teh hijau terdapat empat jenis catechin yaitu epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin-3-gallate (ECG), dan epigallocatechin gallate (EGCG). Proses produksi akan mempengaruhi kualitas dan kuantitas catechin yang terdapat

dalam teh. Jumlah dari catechin juga dipengaruhi oleh asal diperolehnya teh, dan kondisi pertumbuhan dari teh itu sendiri (Chacko *et al.*, 2012). EGCG merupakan kandungan polifenol utama dan yang paling spesifik yang terdapat didalam teh terutama teh hijau serta memiliki peran sebagai antioksidan, antiinflamasi, antiaterogenik, dan dapat mendegradasi proteasome (Mereles *et al.*, 2011). EGCG juga memiliki manfaat sebagai antimikroba, dan dapat melawan resistensi mikroba dengan cara menghancurkan dinding sel, menghambat sintesis sel dan dapat menghancurkan DNA dari mikroba tersebut. EGCG juga dapat mencegah penuaan otak, mencegah penyakit alzheimer serta parkinson (Das *et al.*, 2014). EGCG merupakan antikanker yang sangat efektif yang terdapat di dalam ekstrak daun teh (Cabrera, 2006). EGCG memiliki ikatan rangkap terkonjugasi berupa cincin aromatis dan gugus auksokrom hidroksi (OH) (Sharma *et al.*, 2005) sehingga EGCG dapat dianalisis dengan menggunakan KCKT (Martono, Y & Martono, S, 2012).

Penelitian ini menggunakan produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup karena masyarakat pada umumnya mengonsumsi teh berupa seduhan dari produk teh celup karena mempertimbangkan kepraktisan. Teknik penyeduhan teh di setiap negara atau daerah berbeda-beda, seperti di Cina, penyeduhan teh dilakukan berulang (Yang *et al.*, 2007). Pada beberapa masyarakat ditemukan cara penyeduhan teh celup yang belum sesuai, dimana ditemukan bahwa setiap kantung teh celup dimanfaatkan untuk beberapa cangkir atau satu sendok teh diseduh dengan satu cerek air panas dan kadangkala digunakan berulang-ulang untuk satu hari (Adam, 2006).

Peneliti ingin mengetahui jumlah senyawa EGCG yang masih terlarut hingga penyeduhan ketiga sehingga nantinya dapat diketahui

penyeduhan teh yang berulang tetap dapat memberikan manfaat atau tidak, selain itu peneliti juga ingin mengetahui perbedaan jumlah EGCG yang terlarut dalam produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang pada proses penyeduhannya dilakukan dengan waktu yang berbeda, sehingga dapat dibandingkan proses penyeduhan produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup mana yang memberikan hasil EGCG terlarut yang paling banyak.

Validasi terhadap suatu metode menjadi faktor yang penting karena metode analisa yang telah dibuktikan validitasnya akan memberikan hasil pengukuran yang dapat dipertanggung jawabkan dan dapat dipergunakan sebagai landasan dalam perhitungan selanjutnya (Sugihartini, 2014).

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis adalah selektivitas, linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi, serta akurasi (Harmita, 2004).

Parameter analitik yang diperlukan untuk validasi dapat bervariasi tergantung tipe prosedur analitik. Menurut (USP 30, 2006) terdapat empat kategori, yaitu kategori satu untuk menentukan bahan aktif obat atau bahan aktif. Kategori dua untuk menentukan komponen sisa produk, pengotor maupun degradan. Kategori tiga untuk karakteristik kinerja seperti pelepasan obat. Kategori empat untuk identifikasi.

Penentuan EGCG pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup termasuk kategori satu karena merupakan senyawa mayor yang terdapat dalam produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup, sehingga

parameter validasi yang dilakukan adalah uji selektivitas, linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi, dan akurasi.

Penggunaan KCKT untuk menganalisis kandungan EGCG dapat memberikan hasil yang tepat dan ideal dalam waktu yang singkat (Sharma *et al.*, 2005). Menurut (Purwanto *et al.*, 2010) untuk menganalisis catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, dan caffeine dalam ekstrak teh hijau dengan KCKT digunakan kolom RP-18 dan fase gerak metanol : air : asam asetat = 20 : 75 : 5 (v/v/v).

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode untuk memastikan bahwa metode analisis tersebut dapat digunakan dan dapat memberikan hasil yang sebenarnya. Validasi metode yang dilakukan adalah uji selektivitas, linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi, dan akurasi.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka diperoleh rumusan masalah sebagai berikut:

- a. Bagaimana kondisi validasi metode (Uji selektivitas, linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi serta akurasi) pada penentuan kadar EGCG dalam produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup?
- b. Berapa kadar EGCG dalam produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang diseduh berulang?

1.3. Tujuan Penelitian

- a. Menentukan kondisi validasi metode KCKT (meliputi uji selektivitas, linearitas, batas deteksi dan kuantitasi, presisi serta

akurasi) yang digunakan untuk menentukan kadar EGCG pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup.

- b. Menentukan kadar senyawa EGCG pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang diseduh berulang.

1.4. Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat menentukan kadar senyawa EGCG yang terlarut pada penyeduhan pertama, kedua, dan ketiga dari produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang diseduh berulang.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Teh

Tanaman teh diklasifikasikan oleh botani swedia yang bernama Linnaeus pada tahun 1753. Tanaman ini berdaun hijau yang termasuk kedalam genus *Camellia* dan dikenal sebagai *Camellia sinensis*. Teh ini pada awalnya ditemukan di Cina. Tanaman teh ini dibudidayakan pada daerah tropis dan subtropis, dengan kondisi suhu pada rentang 13-29°C dengan ketinggian 2460 m diatas permukaan laut dengan kondisi tanah yang asam dan kaya akan zat besi dan mangan, dengan pH 3,3-6,0, akan lebih baik jika pH nya sekitar 4,5-5,5 (Zhang, 2012). Penanaman teh dapat dilakukan dengan stek daun (*vegetatif propagation*) dan juga dengan menggunakan biji teh, namun yang sangat umum digunakan adalah stek daun karena hasilnya lebih cepat dan lebih memuaskan. Tanaman teh perlu dipupuk setahun 2 kali dengan pupuk yang mengandung Nitrogen, Phospor, dan Kalium untuk menghasilkan daun yang baik (Atmojo,2012).

Tanaman berdaun hijau ini merupakan tanaman kecil yang selalu dipotong dan dirapikan untuk mendapatkan hasil daun yang baik, memiliki akar yang kuat dan berbunga putih kekuningan dengan diameter bunga 2,5-4 cm. Biji dari buah tanaman ini menghasilkan minyak yang dapat digunakan untuk bumbu pemanis, untuk memasak atau digunakan untuk obat dan kosmetik. Daun tanaman teh ini memiliki panjang 4-15 cm dengan lebar 7-8 cm dan memiliki bulu halus berwarna putih dibagian bawahnya. Daun yang muda dipetik untuk dijadikan produk teh. Perbedaan usia daun akan menghasilkan kualitas produk teh yang berbeda karena komposisi kandungan kimianya juga akan berbeda. Bagian yang digunakan untuk

memberikan efek yang penting. Pada teh hijau daun teh hanya dikeringkan sebagian dan selanjutnya diuapi. Proses uap ini akan menghancurkan enzim folifenol oksidase sehingga folifenol yang dihasilkan (flavanoid termasuk catechin) tidak sekomplek senyawa yang dihasilkan oleh teh hitam yang mengalami fermentasi. Daun teh yang telah diuapi lalu digulung, dipotong, dan dikeringkan tanpa melalui proses fermentasi. Tidak adanya fermentasi serta sedikitnya enzim folifenol oksidase menyebabkan daun tetap dapat mempertahankan warna hijau yang dimiliki (Cabrerre *et al.*, 2006).

Komposisi senyawa kimia didalam teh hijau sangat kompleks, yaitu terdiri dari protein, asam amino seperti theanin atau 5-N-etilglutmin, asam glutamat, tryptofan, glisin, serin, asam aspartat, tirosin, valin, leusin, treonin, arginin, dan lisin, mengandung karbohidrat, mengandung mineral seperti kalsium, magnesium, mangan, kromium, besi, zinc, selenium, natrium, florin, aluminum dan mengandung lemak, vitamin (B,C,E) pigmen (klorofil, dan karoten) serta zat yang mudah menguap (Chacko *et al.*, 2010).

2.1.1.2. Teh Hitam

Teh hitam digambarkan sebagai teh merah karena warna merah seperti merah tembaga yang dihasilkan saat teh ini diseduh. Proses pembuatan teh hitam sangat bervariasi antara negara satu dengan yang lainnya atau daerah satu dengan daerah lainnya namun pembuatannya selalu melalui empat langkah dasar yaitu proses pelayuan, penggulungan, oksidasi, dan pengeringan (Zhang, 2012).

Teh hitam diproduksi dari pucuk dan daun pertama serta kedua dari tanaman *Camellia sinensis* lalu dibiarkan mengering sehingga kelembaban dari daun berkurang dan menyebabkan membran selnya pecah sehingga menyebabkan enzim dan polifenol lepas (Bhattacharyya *et al.*, 2007). Daun tersebut kemudian dipotong dan digulung yang menyebabkan pecahnya sel

compartementalisation lebih lanjut, sehingga polifenol dapat kontak dengan enzim polifenol oksidase selanjutnya daun tersebut masuk ke tahap proses fermentasi. Tahapan fermentasi ini menyebabkan terjadi proses oksidasi sehingga warna teh menjadi coklat dan memberikan aroma pada teh tersebut. Proses oksidasi ini sangat penting untuk menjadikan flavanoid menjadi senyawa yang lebih kompleks yaitu tearubigin dan teaflavin. Tahap akhir dari pembuatan teh hitam adalah pengeringan dengan menggunakan udara panas. Tahap ini tidak hanya untuk mengurangi kelembaban daun namun juga menonaktifkan enzim-enzim (Bhattacharyya *et al.*, 2007).

2.1.1.3. Teh Putih

Teh putih berasal dari daun teh yang muda, atau pucuk teh yang dilapisi dengan bulu halus berwarna silver, dimana daun ini hanya dipetik atau dipanen setahun sekali pada awal musim semi. Pertumbuhan pucuk teh ini selalu dilindungi dari sinar matahari langsung, untuk mengurangi pembentukan klorofil, sehingga memberikan warna putih pada daun yang muda (Tomas *et al.*, 2013).

Pembuatan teh putih mirip dengan teh hijau. Teh putih juga diuapi lalu dikeringkan untuk mencegah fermentasi. Teh putih langsung diuapi dan dikeringkan segera setelah daun teh dipetik. Daun teh tidak melalui proses pelayuan, sehingga merupakan proses produksi teh yang singkat dibandingkan teh yang lainnya (Rosak *et al.*, 2008).

Terdapat beberapa manfaat teh putih dalam kesehatan seperti teh putih mengandung kafein yang lebih sedikit dibanding teh hijau, teh putih mengandung antioksidan yang lebih tinggi terutama katekin dibanding teh hijau, dan teh putih memiliki anti mutagenik lebih tinggi dibanding teh hijau (Hilal *et al.*, 2007).

2.1.1.4. Teh Oolong

Teh oolong dikenal sebagai teh yang mengalami oksidasi sebagian atau semi oksidasi (semi fermentasi) dan terkadang dikenal sebagai teh biru atau teh biru kehijauan, pada awalnya teh ini diproduksi di cina, namun saat ini beberapa negara sudah memproduksi teh oolong ini (Zhang, 2012).

Teh oolong diproduksi dengan cara yang sama dengan teh hitam, namun memiliki waktu fermentasi yang lebih singkat dibandingkan dengan teh hitam, teh oolong memiliki waktu yang lebih sedikit untuk mengalami oksidasi, sehingga rasa dan warna dari teh oolong berada diantara teh hijau dan teh hitam (Rosak *et al.* 2008).

Teh oolong merupakan teh semi fermentasi, teh ini dapat mempertahankan nutrisi-nutrisi dan faktor-faktor yang terkandung didalam teh yang tidak difermentasi seperti teh hijau, tetapi tidak dengan rasa mentah seperti rumput yang dimiliki teh hijau yang dapat mempengaruhi kondisi pencernaan pada beberapa orang, sehingga beberapa orang tidak menyukai teh hijau (Zhang, 2012).

Proses fermentasi yang singkat pada teh oolong mampu menghilangkan pengganggu kasar yang terdapat pada bahan mentah pembuat teh dan membuat teh ini memiliki bau dan rasa yang halus dibandingkan jenis teh lainnya, serta pada teh oolong tidak terjadi proses pembentukan tanin yang terdapat didalam teh yang mengalami fermentasi penuh seperti teh hitam. Proses penanaman dan perlakuan yang diberikan terhadap teh oolong selama proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman teh ini mirip seperti wine, dimana perbedaan tempat menanam atau berbeda pegunungan yang dijadikan tempat penanaman akan menghasilkan rasa yang unik, dan proses panen setiap tahunnya akan memberikan karakter rasa dan aroma tersendiri bagi teh oolong tersebut (Zhang, 2012).

2.1.1.5. Teh Pu-erh

Teh pu-erh menjadi terkenal akhir-akhir ini, terutama di asia tenggara dikarenakan manfaat kesehatan yang diberikan oleh teh pu-erh ini, selain itu karena teh pu-erh memiliki rasa dan aroma yang unik (Lv *et al.*, 2013).

Teh pu-erh merupakan teh yang termasuk kedalam teh hitam Cina, dan sudah menarik perhatian dunia. Fermentasi padat dengan bantuan mikroorganisme yang terjadi pada proses pembuatan teh pu-erh menjadikan teh ini memiliki karakteristik yang unik, seperti warna coklat kemerahan, rasa yang lembut, dan aroma yang stabil (Lv *et al.*, 2014).

Teh pu-erh dikarakteristikan oleh perbedaan lingkungan produksi, bahan genetik, dan proses pembuatan, sehingga karakteristik yang dimiliki oleh teh pu-erh ini yang membedakan teh pu-erh dengan teh yang lainnya (Ahmed *et al.*, 2013).

Teh pu-erh dibuat dari pucuk daun teh ataupun dua atau tiga daun yang berada dibawahnya. daun teh segar yang telah dipetik disebar diatas tikar bambu selama kurang lebih selama 8 jam untuk mendapatkan hasil yang kering sebagian kemudian daun tersebut diproses untuk menonaktifkan enzimnya dengan cara dipanaskan dengan menggunakan drum untuk menonaktifkan enzim Polifenol oksidase (Liang *et al.*, 2005).

Proses penggulungan daun pada pembuatan teh pu-erh lebih singkat dibandingkan pada proses pembuatan teh hijau, sehingga akan menurunkan laju pemecahan sel, dan untuk memproduksi daun lepasan yang akan digunakan untuk *post* fermentasi. Sebelum masuk tahap fermentasi, daun teh yang sudah digulung tersebut dikeringkan dibawah sinar matahari selama 3 sampai 5 jam dengan suhu 30°C untuk mendapatkan kelembaban daun sebesar 8%. Daun teh yang sudah kering ditumpuk selama beberapa

minggu, agar terjadi proses oksidasi, kondensasi dan degradasi dari kandungan senyawa kimia yang terdapat didalam daun teh tersebut. Selama proses *post* fermentasi, mikroorganisme memiliki peranan besar untuk membuat aroma dan rasa dari teh pu-erh menjadi unik (Lv, *et al.*, 2013).

2.1.2 Kandungan Teh

Senyawa yang terkandung di dalam daun teh berbeda-beda, dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain iklim, musim, cara memetik daun, dan umur daun yang dipetik. Kandungan yang terdapat dalam teh hijau mirip seperti yang terdapat dalam daun teh. Teh hijau mengandung senyawa polifenol seperti flavonoid, dan asam fenolat. Teh hitam mengandung polifenol yang utama adalah teaflavin dan tearubigin (Mukhtar & Ahmad, 2000). Catechin merupakan metabolit sekunder yang diproduksi secara alami oleh tanaman teh yang termasuk kedalam golongan polifenol yang sebagian besar ada di dalam teh. Catechin pada daun teh terdiri dari empat jenis yaitu epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin-3-gallate (ECG), dan epigallocatechin gallate (EGCG) (Towaha, 2013). Teh mengandung asam amino, karbohidrat, vitamin A, E, K. Teh juga mengandung kalium, mangan, dan florida, selain itu juga mengandung metilxantin yang berupa kafein, teofilin, dan teobromin (Chaturvedula & Prakash, 2011).

Tabel II.1 komposisi teh hijau dan teh hitam (Robb & Brown, 2001).

No	Compound	Green Tea	Black Tea
1	Catechins	10-30%	3-10%
2	Theaflavins	0	2-6%
3	Thearubigins	0	10-20%
4	Phenolic acids	2%	1%
5	Flavonols	2%	1%
6	Other Polyphenols	3-6%	3-10%
7	Caffeine, Theobromine, and theophylline	3-6%	3-6%
8	Amino acids	~10 mg/g	~5 mg/g
9	Theanine	2%	-
10	Peptides, protein	6%	6%
11	Organic acids	2%	2%
12	Mono- and disaccharides	11 mg/g	11 mg/g
13	Mineral substances	10-13%	10-13%

2.1.3 Manfaat Teh

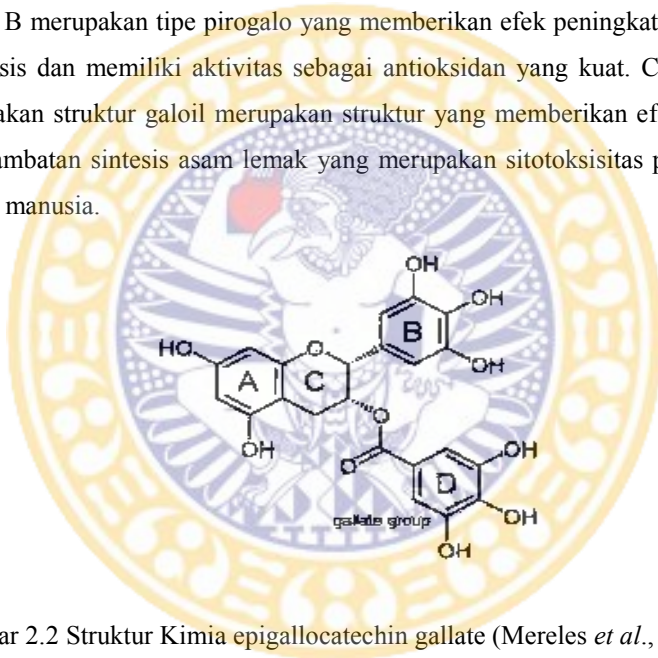
Manfaat dari teh didapatkan terutama karena adanya polifenol yang merupakan senyawa yang berperan sebagai antimikroba dan antioksidan. Polifenol terdapat diseluruh jenis teh yang berasal dari *Camellia sinensis* (Cabrera *et al.*, 2006).

Efek antimikroba dari ekstrak teh yang berasal dari *Camellia sinensis* telah diobservasi pada beberapa bakteri, seperti *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* dimana pertumbuhan dari bakteri dihambat sehingga membunuh bakteri tersebut. Efek antimikroba ini juga dapat digunakan untuk bakteri berupa *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, dan *Salmonella enteritidis* (Miller, 1995).

Teh juga dapat digunakan untuk mengontrol berat badan, memiliki sifat sebagai antihipertensi, dan kandungan EGCG dalam teh juga memiliki manfaat sebagai antidiabetes (Chacko *et al.*,2010).

2.2 Tinjauan Tentang EGCG

EGCG adalah polifenol yang memiliki banyak manfaat untuk kesehatan. Struktur kimia dari EGCG adalah seperti gambar dibawah ini. Cincin B merupakan tipe pirogalo yang memberikan efek peningkatan pada apoptosis dan memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang kuat. Cincin D merupakan struktur galoil merupakan struktur yang memberikan efek pada penghambatan sintesis asam lemak yang merupakan sitotoksisitas pada sel kanker manusia.



Gambar 2.2 Struktur Kimia epigallocatechin gallate (Mereles *et al.*, 2011)

EGCG memiliki rumus kimia $C_{22}H_{18}O_{11}$ memiliki berat molekul 458,4. EGCG berbentuk serbuk putih dengan kelarutan 1:0,2 dalam air. Titik lebur dari EGCG adalah 218 °C. EGCG stabil pada temperatur kamar dan penyimpanan pada tempat kering, bebas udara dan cahaya setidaknya 2 tahun (Budavari, 2000).

2.3 Tinjauan Tentang KCKT

Kromatografi adalah teknik analisis dengan pemisahan molekul dari struktur atau memisahkan senyawa dari senyawa campuran. Pada kromatografi, perpindahan sampel dalam sistem melibatkan fase diam. Molekul-molekul dalam sampel akan memiliki interaksi yang berbeda terhadap fase diam. Komponen pada sampel yang memiliki ketertarikan kuat terhadap fase diam akan bergerak lebih lambat menuju kolom dibandingkan senyawa yang ketertarikannya lebih lemah terhadap fase diam (Kupiec, 2004).

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) adalah kromatografi yang dapat digunakan untuk memisahkan senyawa campuran dan dapat digunakan pada senyawa biokimia maupun menganalisis senyawa kimia untuk identifikasi, kuantifikasi, dan purifikasi senyawa individu yang didapat dari senyawa campuran yang dianalisis tersebut (Zhang, 2012). KCKT memiliki keuntungan dibandingkan *Gas Chromatography* (GC) adalah dimana penggunaan KCKT tidak harus untuk analit yang bersifat mudah menguap, sehingga makromolekul juga dapat dianalisis oleh KCKT (Sundaram *et al.*, 2009).

KCKT digunakan untuk menganalisis senyawa yang terdapat dalam larutan. Larutan sampel kontak dengan fase diam dan senyawa-senyawa didalam larutan sampel memiliki ketertarikan berbeda akan menyebabkan terjadi pemisahan senyawa senyawa tersebut (Kupiec, 2004).

Pemisahan komponen-komponen dari senyawa campuran tergantung dari retensi masing-masing komponen pada kolom. Sedikit banyaknya komponen yang tertahan pada kolom tergantung pada partisi senyawa tersebut terhadap fase diam dan fase geraknya. Selama senyawa memiliki perbedaan mobilitas, maka senyawa akan keluar dari kolom

dengan waktu yang berbeda, sehingga memiliki waktu retensi yang berbeda. Waktu retensi adalah waktu antara penyuntikkan dan deteksi (Sundaram *et al.*, 2009). Waktu retensi dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti, interaksi senyawa dengan fase diam, molekul yang dianalisis, dan juga solven yang digunakan (Bansal *et al.*, 2009).

Sampel yang akan diinjeksi ke KCKT sebelumnya harus disaring terlebih dahulu untuk menghilangkan partikel pengganggu. Sampel harus dilarutkan terlebih dahulu menggunakan fase gerak yang akan dipakai pada KCKT untuk mendapatkan bentuk peak yang baik. Pada KCKT volume sampel yang akan digunakan untuk deteksi dipengaruhi oleh diameter internal kolom (Sundaram *et al.*, 2009).

2.3.1 Mekanisme KCKT

Sistem yang digunakan dalam KCKT dikategorikan menjadi 4 grup berdasarkan mekanisme aksinya yaitu adsorpsi, partisi, dan penukar ion. Adsorpsi berasal dari interaksi antara solut dengan permukaan fase diam. Partisi melibatkan fase diam yang cair yang *immiscible* dengan eluen dan melapisi bahan yang inert. Penukar ion menggunakan fase diam yang mampu menukar ion dari sampel. *Size exclusion* ini menggunakan fase diam yang terdiri dari bahan yang ukuran porinya dikontrol dengan tepat (Kupiec, 2004).

2.3.2 Tipe KCKT

Tipe KCKT tergantung dari fase yang digunakan saat proses. Berikut tipe KCKT yang umum digunakan adalah KCKT fase normal, KCKT fase terbalik, *Size Exclusion Chromatography*, *Ion exchange Chromatography* Bansal *et al.*, 2009).

2.3.2.1 KCKT Fase Normal

Pada KCKT fase normal ini, pemisahan didasari atas kepolaran. Fase diam yang digunakan untuk KCKT fase normal ini adalah fase diam yang polar. Kekuatan adsorpsi meningkat apabila kepolaran dari analit yang akan dianalisis juga memiliki kepolaran yang meningkat, sehingga interaksi antara analit polar dengan fase diam juga akan meningkat sehingga membutuhkan waktu elusi yang lebih besar (Bansal *et al.*, 2009).

2.3.2.2 KCKT Fase Terbalik

Pada KCKT fase terbalik fase diamnya berupa nonpolar dan fase geraknya menggunakan senyawa polar. (Bansal *et al.*, 2009).

2.3.2.3 KCKT Penukar Ion

Pada KCKT Penukar ion, pada kolomnya mengandung ion. KCKT ini digunakan untuk memurnikan air, pada protein, karbohidrat, dan oligosakarida (Bansal *et al.*, 2009).

2.3.3 Komponen KCKT



Gambar 2.3 Komponen KCKT (Kupeic,2004).

Tipe dan komposisi dari fase gerak akan mempengaruhi keterpisahan dari senyawa yang akan dianalisis. Perbedaan tipe KCKT akan menyebabkan perbedaan fase gerak yang digunakan. Solven yang digunakan untuk fase gerak paa KCKT fase normal biasanya berupa solven non polar. KCKT fase terbalik solven yang digunakan merupakan campuran air dan solven organik polar (Kupeic, 2004).

Solven reservoir pada umumnya menggunakan botol gelas yang sederhana dengan pipa yang menghubungkan reservoir ke pompa (Kupeic, 2004).

Pompa yang digunakan pada KCKT harus memiliki tekanan yang tinggi, hal ini diperlukan untuk mendorong fase gerak agar dapat melalui fase diam. Pompa dengan tekanan kuat (biasanya sekitar 1000-2000 psi) diperlukan untuk memastikan reproduibel dan akurasi dari KCKT tersebut (Kupeic, 2004).

Injektor yang digunakan pada KCKT dapat berupa injektor single ataupun injektor otomatis. Injektor harus dapat digunakan untuk menginjeksi cairan sampel dengan volume sekitar 0,1-100 ml dengan reproduibel tinggi dan dibawah tekanan yang tinggi (sampai 4000 psi) (Kupeic, 2004).

Kolom atau fase diam merupakan komponen pokok di dalam KCKT. Kolom dijual dengan berbagai panjang, dengan ukuran partikel yang berbeda-beda. Penggunaan kombinasi panjang kolom dan ukuran partikel yang sesuai akan memberikan hasil yang baik (Kupeic, 2004). Fase diam pada kolom KCKT modern umumnya menggunakan fase organik yang terikat secara kimia dengan silika atau bahan lain. Fase diam yang digunakan pada KCKT fase normal adalah bersifat polar, sedangkan fase gerak yang digunakan bersifat nonpolar. KCKT fase terbalik menggunakan fase diam yang bersifat nonpolar dan fase geraknya bersifat polar (Gupta,2012).

Detektor yang umumnya digunakan pada KCKT adalah Indeks Refraktif (IR), Ultraviolet visibel Detektor (PDA), Detektor floresens (Kupeic, 2004).

Data diperoleh dari alat yang dapat mengubah signal elektrik yang dihasilkan oleh detektor. Alat yang digunakan adalah komputer (Kupeic, 2004).

2.3.4 Parameter Kromatografi

2.3.4.1 Faktor Retensi (k')

Faktor retensi (k') atau dikenal sebagai perbandingan kapasitas kolom. Semakin lama suatu senyawa tertahan pada kolom maka faktor kapasitas kolom juga akan semakin besar. Faktor kapasitas kolom dapat ditentukan melalui persamaan berikut:

$$K = \frac{T_a - T_o}{T_o} = \frac{V_a - V_o}{V_o}$$

Keterangan:

V_a = Volume eluasi dari komponen A

V_o = Volume eluasi dari senyawa yang tidak tertahan

(T_a dan T_o) = Waktu Retensi

(Kupiec, 2004)

2.3.4.2 Resolusi

Resolusi adalah kemampuan kolom untuk memisahkan peak pada kromatografi. Resolusi ditunjukkan dari perbandingan antara dua jarak peak dan rata-rata lebar dua peak dari garis dasar.

$$R_s = (t_{RA} - t_{RB}) : 0,5 (W_A + W_B)$$

Keterangan:

t_{RA} = Waktu retensi dari komponen A

t_{RB} = Waktu retensi dari komponen B

W_A = Lebar area peak komponen A

W_B = Lebar area peak komponen B

Apabila nilai $R_s \geq 1,5$ maka komponen-komponen tersebut telah terpisah seutuhnya, apabila nilai R_s kurang dari satu, maka komponen-komponen tersebut saling tumpang tindih (Kupeic, 2004)

2.3.4.3 Faktor Selektivitas (α)

Faktor selektivitas digunakan untuk mengukur seberapa baik kolom dapat memisahkan dua senyawa. Faktor selektivitas dari suatu senyawa dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\alpha = \frac{t_R b - t_m}{t_R a - t_m}$$

Keterangan:

$(t_R)_b$ = waktu retensi untuk senyawa B yang tertahan lebih lama pada kolom

$(t_R)_a$ = waktu retensi untuk senyawa A yang tertahan lebih sebentar pada kolom

(t_m) = waktu retensi pelarut

Apabila nilai dari faktor selektivitas sebesar 1, maka metode tersebut tidak dapat memisahkan dua senyawa (Prichard *et al.*, 2003).

2.3.5 Parameter Validasi

Validasi dari suatu proses analisis merupakan suatu proses yang bertujuan untuk memastikan bahwa seluruh proses akan menghasilkan hasil yang akurat, dan valid (Epshtein, 2002).

Tabel II.2 Elemen data yang dibutuhkan untuk validasi (USP 30, 2006)

Analytical Performance Characteristics	Category I	Category II		Category III	Category IV
		Quantitative	Limit Tests		
Accuracy	Yes	Yes	*	*	No
Precision	Yes	Yes	No	Yes	No
Specificity	Yes	Yes	Yes	*	Yes
Detection Limit	No	No	Yes	*	No
Quantitation Limit	No	Yes	No	*	No
Linierity	Yes	Yes	No	*	No
Range	Yes	Yes	*	*	No
*May be required, depending on the nature of specifi test.					

Penentuan kadar EGCG pada penelitian ini termasuk dalam kategori satu, hal ini disebabkan EGCG merupakan senyawa mayor dalam teh, sehingga diperlukan beberapa parameter validasi yaitu selektivitas, linieritas, akurasi, presisi, batas deteksi (BD) dan batas kuantifikasi (BK).

2.3.5.1 Spesifitas

Spesifitas menandakan kemampuan suatu kromatografi memisahkan senyawa induk atau yang akan dianalisis dengan senyawa lainnya baik pengotor maupun senyawa tambahan atau plasebo. Spesifitas dari suatu metode atau prosedur dilihat dari peak yang dihasilkan akan memiliki keterpisahan yang baik antara senyawa satu dengan lainnya. Keterpisahan dari suatu peak biasanya digambarkan dengan nilai R_s . Nilai R_s yang dapat diterima adalah $R_s \geq 1,5$ (Epshtein,2002).

2.3.5.2 Linieritas

Linieritas adalah kemampuan suatu metode menghasilkan hasil yang proporsional secara langsung terhadap konsentrasi analit, atau hasil yang dihasilkan proporsional setelah melalui proses perhitungan secara matematika yang pada umumnya digambarkan melalui kurva persamaan regresi. Linieritas suatu hasil dapat dilihat menggunakan beberapa parameter, diantaranya hasil standar deviasi relatif (V_{xo}) yang didapat melalui rumus berikut:

$$V_{xo} = S_{xo} / \bar{x} \cdot 100\% \text{ (Yuwono \& Indrayanto, 2007)}$$

2.3.5.3 Presisi

Presisi merupakan ukuran derajat keterulangan dari suatu metode analisis yang biasanya ditunjukkan dari persen standar deviasi relatif (Shabir, 2004).

Nilai standar deviasi relatif dan persen standar deviasi relatif dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$KV = \frac{SD}{\bar{X}}$$

$$SD = \frac{\sqrt{(X - \bar{X}^2)}}{n - 1}$$

Keterangan :

KV = koefisien variasi

$\frac{SD}{\bar{X}}$ = Standart deviasi

\bar{X} = kadar sampel rata-rata

X = kadar sampel

2.3.5.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi (LOD) adalah konsentrasi senyawa minimum yang masih dapat dideteksi pada suatu metode. LOD dapat digunakan untuk

mendeteksi batasan konsentrasi *impurity* dari suatu senyawa. LOD dapat dipengaruhi oleh beberapa hal seperti detektor dan pompa HPLC yang digunakan. Nilai LOD dapat ditentukan dengan rumus berikut:

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{b}$$

Sedangkan batas kuantitasi (LOQ) merupakan konsentrasi minimum senyawa yang masih dapat diukur dalam kondisi presisi, dan akurasi yang dapat diterima. Nilai LOQ dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{b}$$

2.3.5.5 Akurasi

Akurasi dari suatu metode adalah kedekatan hasil kadar yang diperoleh dengan nilai kadar yang sebenarnya. Nilai akurasi dinyatakan dengan persen perolehan kembali (recovery) yang diperoleh dengan membuat tiga sampel dengan rentang konsentrasi 50-150%. Nilai persen perolehan kembali (recovery) yang dapat diterima menurut FDA adalah antara rentang 80-120% (Shabir, 2004).

Harga persen perolehan kembali dihitung dengan rumus:

$$R = \frac{C_{sp}}{K_s} \times 100\%$$

$$C_{sp} = \frac{A_{sp}}{A_{st}} \times C_{st}$$

Keterangan :

R = % perolehan kembali

C_{sp} = kadar yang didapatkan kembali

K_s = kadar sesungguhnya

A_{sp} = area sampel

A_{st} = area standart

C_{st} = konsentrasi standart (Harmita, 2004).

2.3.6 Tinjauan tentang Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan bahan aktif dari tanaman (atau hewan) dengan menggunakan pelarut tertentu melalui prosedur yang telah distandarisasi. Proses ekstraksi dilakukan untuk memisahkan antara metabolit dari suatu tanaman yang larut dan metabolit yang tidak larut dalam pelarut tertentu yang digunakan. Hasil dari ekstraksi ini masih mengandung senyawa berupa metabolit kompleks dalam bentuk cair, setengah padat, maupun dalam bentuk serbuk. Proses ekstraksi meliputi proses persiapan berupa dekoksisi, infusi, tincture. Tujuan dari proses ekstraksi adalah untuk memperoleh metabolit yang memberikan efek terapeutik dan memisahkannya dari metabolit yang tidak diinginkan (Longo *et al.*, 2008)

Pemilihan metode ekstraksi tergantung dari sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi. Jenis-jenis metode ekstraksi yang dapat digunakan adalah sebagai berikut:

2.3.6.1 Maserasi

Metode ini dilakukan dengan cara memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan saat tercapai keadaan seimbang antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman setelah proses ekstraksi pelarut dipisahkan dengan cara penyaringan (Mukhriani, 2014).

2.3.6.2 Sokletasi

Sokletasi adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru dan yang umumnya dilakukan dengan alat kusus sehingga terjadi

ekstrak kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Ditjen POM, 2000).

2.3.6.3 Perkolasi

Pada metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah (Mukhriani, 2014).

2.3.6.4 Infusi

Infusi segar disiapkan dengan cara melakukan maserasi dengan waktu yang singkat pada bahan baku dengan menggunakan air dingin ataupun air mendidih sehingga didapatkan larutan yang mengandung bahan dari bahan baku yang larut dalam pelarut (Longo *et al.*, 2008).

2.3.6.5 Reflux

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Dirjen POM, 2000).

2.3.6.5 Sonikasi (Ekstraksi Ultrasound)

Pada proses ini menggunakan ultrasound dengan frekuensi antara 20 kHz – 2000 kHz. Proses ini akan meningkatkan permeabilitas dari dinding sel tanaman dan meningkatkan terbentuknya rongga (Longo *et al.*, 2010).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual

Teh mengandung flavonoid seperti flavonol, flavon, catechin (flavanol), antosianidin, dan isoflavon (Dias *et al.*, 2013). Catechin merupakan senyawa polifenol utama yang terkandung dalam teh dalam jumlah 5-27% dimana pada teh hijau kadarnya lebih tinggi dibandingkan pada teh hitam. Catechin terdiri dari empat jenis senyawa yaitu EC, ECG, EGC, dan EGCG. Kandungan catechin yang terbanyak di dalam teh adalah EGCG dengan jumlah 48-55% dari total senyawa polifenol yang terdapat di dalam teh (Uzunalic *et al.*, 2006).

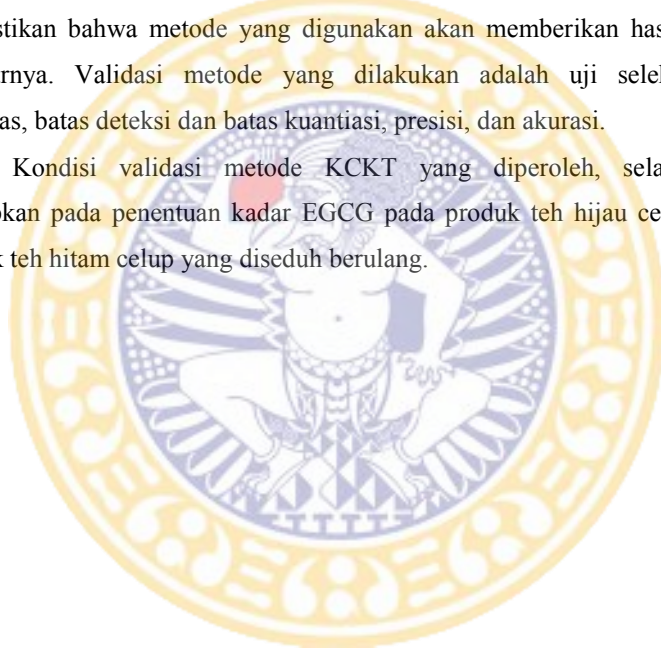
Faktor yang mempengaruhi jumlah senyawa EGCG yang terdapat didalam seduhan teh celup adalah komposisi teh, dan cara penyeduhan. Cara penyeduhan teh meliputi berat teh yang digunakan, ukuran partikel teh yang terdapat dalam teh celup, dimana ukuran partikel teh dalam teh celup lebih kecil dibanding ukuran daun teh sehingga berpengaruh terhadap luas permukaan ekstrak teh yang kontak dengan pelarut, suhu penyeduhan teh, waktu penyeduhan (Peterson *et al.*, 2005).

Kelarutan EGCG dalam air adalah 1:0,2 (Budavari,2000), sehingga dengan demikian senyawa EGCG yang terdapat pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang diseduh berulang sebagian besar akan terlarut pada penyeduhan pertama dan kedua, dimana pada penyeduhan pertama jumlah EGCG terlarut lebih besar dibandingkan pada penyeduhan kedua, sehingga pada penyeduhan ketiga senyawa EGCG yang terlarut dalam jumlah yang sangat sedikit.

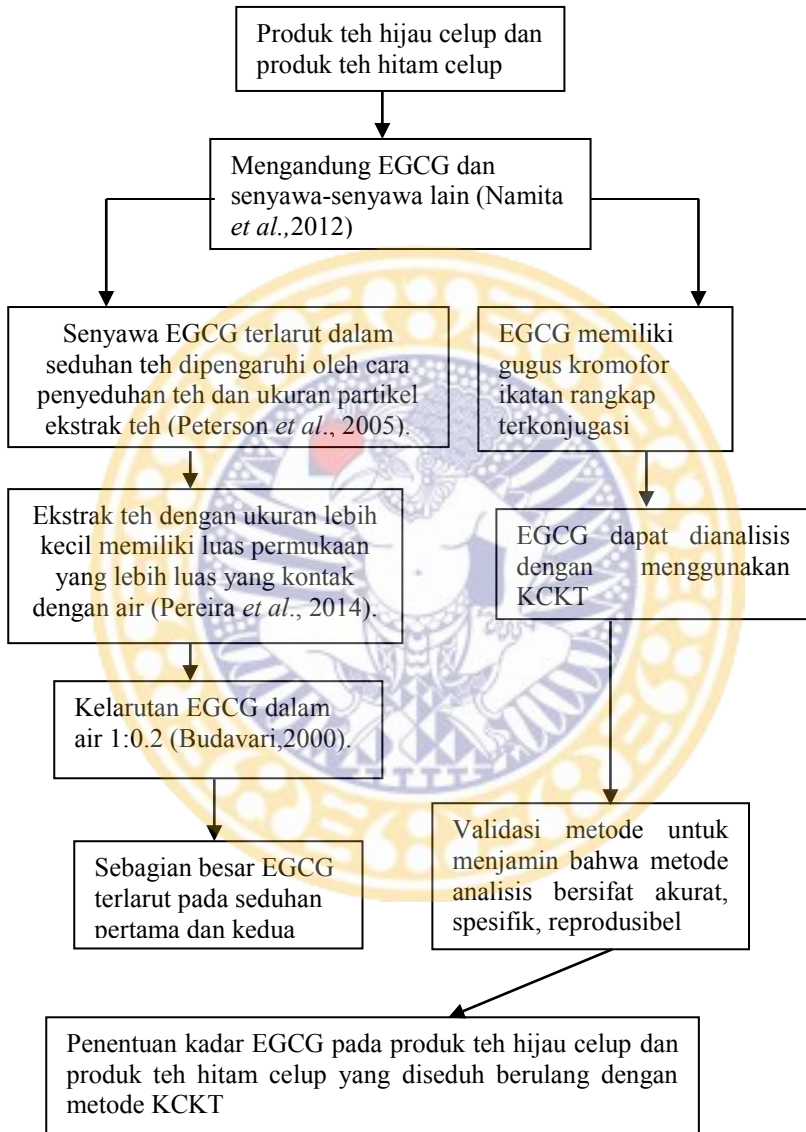
EGCG memiliki gugus kromofor yang ditandai dengan adanya ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur EGCG, serta memiliki gugus auksokrom karena adanya substituen hidroksil (-OH) yang terikat pada cincin aromatis. Dengan adanya gugus kromofor dan gugus auksokrom, menurut (Sharma *et al.*, 2005) EGCG dapat dianalisis dengan metode KCKT.

Pada penelitian ini juga dilakukan validasi metode untuk memastikan bahwa metode yang digunakan akan memberikan hasil yang sebenarnya. Validasi metode yang dilakukan adalah uji selektivitas, linieritas, batas deteksi dan batas kuantiasi, presisi, dan akurasi.

Kondisi validasi metode KCKT yang diperoleh, selanjutnya diterapkan pada penentuan kadar EGCG pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang diseduh berulang.



3.2 Bagan Kerangka Konseptual



3.3 Hipotesa

- a. Metode KCKT yang digunakan untuk penentuan kadar EGCG pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup memenuhi persyaratan validasi metode.
- b. Kadar EGCG yang tinggi terdapat pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup pada seduhan pertama.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Alat

- a. Neraca analitik (Sartorius BL 210 S), Membran filter whatman (diameter pori 0,2 μm)
- b. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)
Jenis : Agilent 1100
Detektor : *Photo Diode Array*
Kolom : kolom μ bondapak RP C-18 (10 μm 3,9x300 mm)

4.2. Bahan

Standar EGCG (Xi'an Rhongseng Co.Ltd.pa), Produk teh hijau celup yang beredar di Surabaya, Produk teh hitam celup yang beredar di Surabaya, Kloroform (E Merck, p.a), Etil asetat (E Merck, p.a), Metanol (E Merck, p.a), *Water pro Injection*

4.3 Variabel Penelitian

- | | |
|---------------------|-----------------------|
| Variabel bebas | : Penyeduhan berulang |
| Variabel terikat | : Kadar EGCG |
| Variabel Penghubung | : Proses penyeduhan |

4.4 Definisi Operasional

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang beredar di Surabaya. Penyeduhan dilakukan sebanyak 3 kali terhadap sampel produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang sama selama 5 menit, dan dilakukan juga

penyeduhan 1 kali selama 20 menit dan 10 menit pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup.

4.5 Metode Penelitian

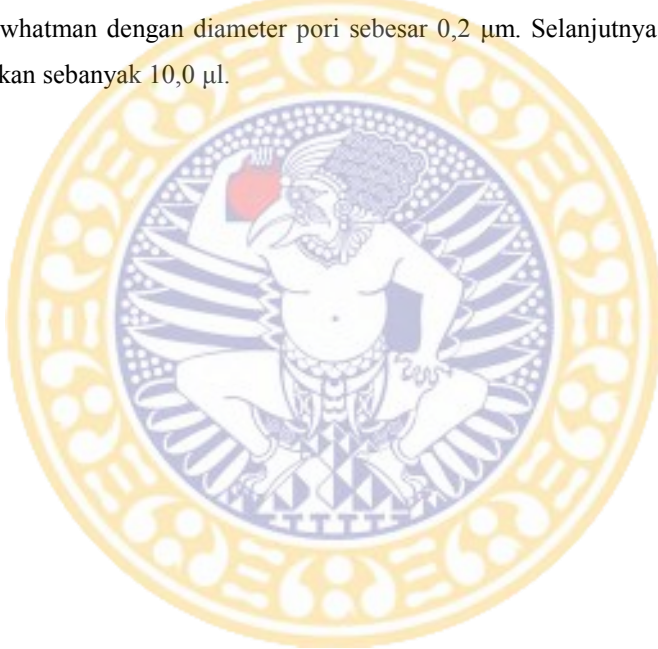
4.5.1 Penetapan Kadar Air

Sampel produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup ditimbang sebanyak 10,0 g, kemudian dioven pada suhu 105° C, selama 5 jam, lalu dinginkan pada eksikator, kemudian timbang. Pemanasan dilanjutkan selama 1 jam pada suhu yang sama lalu dinginkan pada eksikator, kemudian timbang (perbedaan dari kedua penimbangan berturut-turut tidak boleh lebih dari 0,25%) (Farmakope Indonesia V, 2014).

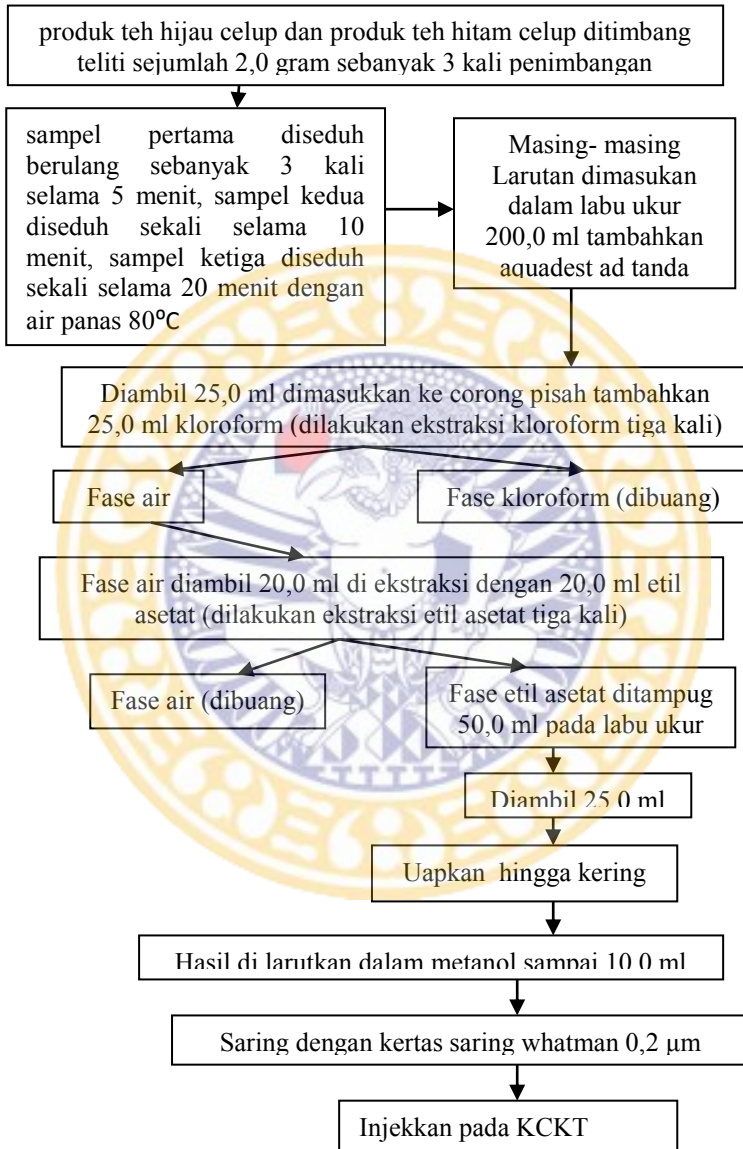
4.5.2 Ekstraksi EGCG dari produk teh hijau dan produk teh hitam

Masing-masing sampel produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup ditimbang teliti sejumlah 2,0 gram sebanyak 3 kali penimbangan. Pada Sampel pertama dilakukan penyeduhan berulang menggunakan sampel yang sama sebanyak 3 kali selama 5 menit dengan air panas 80°C masing-masing sebanyak 200,0 ml lalu dimasukkan ke 3 labu ukur 200,0 ml ditambahkan aquadest ad tanda pada labu ukur yang berbeda. Sampel produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup kedua dilakukan penyeduhan sebanyak sekali dengan air panas 80°C sebanyak 200,0 ml selama 10 menit lalu dimasukkan ke labu ukur 200,0 ml ditambahkan aquadest ad tanda, Sampel teh ketiga dilakukan penyeduhan sebanyak satu kali dengan air panas 80°C sebanyak 200 ml selama 20 menit lalu dimasukkan ke labu ukur 200,0 ml ditambahkan aquadest ad tanda. masing-masing sampel diekstraksi dengan mengambil sampel sebanyak 25,0 ml dimasukkan ke corong pisah kemudian ditambahkan dengan kloroform sebanyak 25,0 ml lalu dikocok (ekstraksi dengan kloroform dilakukan tiga

kali). Fase kloroform dibuang, dan didapat fase air kemudian dari fase air diambil sebanyak 20,0 ml dan ditambahkan dengan etil asetat sebanyak 20,0 ml dalam corong pisah kemudian dikocok (ekstraksi dengan etil asetat dilakukan tiga kali). Kemudian didapat fase etil asetat ditampung sebanyak 50,0 ml pada labu ukur, fase etil asetat tersebut diambil 25,0 lalu diuapkan hingga kering yang kemudian dilarutkan metanol pro HPLC ad 10,0 ml, sebelum disuntikkan ke KCKT larutan disaring dengan menggunakan kertas saring whatman dengan diameter pori sebesar 0,2 μm . Selanjutnya larutan disuntikan sebanyak 10,0 μl .



4.5.3 Penyederhanaan Matriks



4.5.4. Penentuan Panjang Gelombang

Dibuat larutan standar EGCG dalam pelarut metanol dengan konsentrasi 20 µg/ml dan 40 µg/ml . Larutan ini dibuat spektra serapannya pada panjang gelombang 220-360 nm (Martono Y *et al.*, 2005) dengan blanko metanol. Dari hasil spektra serapan dapat dilihat panjang gelombang maksimal yang akan digunakan dalam analisis metode KCKT.

4.5.5 Optimasi fase gerak

Fase gerak yang digunakan dalam penetapan kadar EGCG ini merupakan campuran metanol : air : asam asetat 20 : 75 : 5 v/v/v (Purwanto *et al.*, 2010). Dibuat Larutan standar EGCG 40,0 µg/ml, larutan sampel produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang telah dipreparasi, dan larutan sampel produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang telah dipreparasi sebanyak 10,0 ml ditambah larutan standar EGCG 40,0 µg/ml. Masing-masing larutan disaring dengan kertas whatman 0,2 µm disuntikkan sebanyak 10,0 µl ke KCKT yang dieluasi dengan fase gerak tersebut dengan kecepatan alir 1,0 ml/min.

4.5.6 Spesifisitas

Dibuat larutan baku EGCG, larutan uji sampel dan blanko dengan menggunakan metanol. Larutan baku EGCG dibuat dengan kadar 40,0 µg/ml kemudian disaring menggunakan penyaring whatman berdiameter 0,2 µm. Selanjutnya sebanyak 10,0 µl sampel produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang telah diekstraksi disuntikkan ke dalam KCKT. Pada daerah sekitar waktu retensi EGCG tidak boleh ditemukan adanya gangguan yang dapat dilihat dari profil kromatogram. Selain itu juga dilakukan perhitungan harga Resolusi (Rs). Uji spesifisitas dikatakan

memenuhi persyaratan apabila nilai α lebih besar dari 1 dan R_s lebih besar dari 1,5.

4.5.7 Linearitas

Seri larutan baku dibuat pada konsentrasi 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 100,0; dan 400,0 $\mu\text{g/ml}$. Kemudian larutan disaring dengan kertas saring whatman dengan diameter pori 0,2 μm yang selanjutnya diinjekkan ke KCKT. Kemudian membuat persamaan garis regresi $y = bx + a$ dengan kadar EGCG sebagai variabel x dan area masing – masing puncak sebagai variabel y lalu dihitung harga r dan V_{xo} .

4.5.8 Penetapan Batas Deteksi Dan Kuantitasi

Batas deteksi dan batas kuantitasi ditentukan dengan menginjekkan berbagai konsentrasi, sehingga dibuat larutan standar EGCG dengan konsentrasi (0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,50; 5,00; 6,00; 8,00; dan 10,00 $\mu\text{g/ml}$). Larutan tersebut disaring dengan kertas saring whatman dengan diameter pori 0,2 μm kemudian disuntikkan sebanyak 10,0 μl ke KCKT. Dari hasil eluasi akan didapatkan data luas area untuk dibuat persamaan garis. Perhitungan batas deteksi dilakukan dengan menggunakan rumus berikut :

$$LOD = \frac{3 \times SD}{b}$$

Keterangan : SD = Standart deviasi
 b = slope (b pada persamaan garis $y=bx+a$)

Untuk perhitungan Batas Kuantitasi digunakan rumus berikut:

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{b}$$

Keterangan : SD = Standart deviasi
b = slope (b pada persamaan garis $y=bx+a$)

4.5.9 Presisi

a. Presisi Intraday

Larutan standar EGCG 40,0 µg/ml diinjeksikan pada KCKT dan dieluasi dengan fase gerak terpilih sebanyak 6 kali kemudian dihitung nilai KV.

b. Presisi Interday

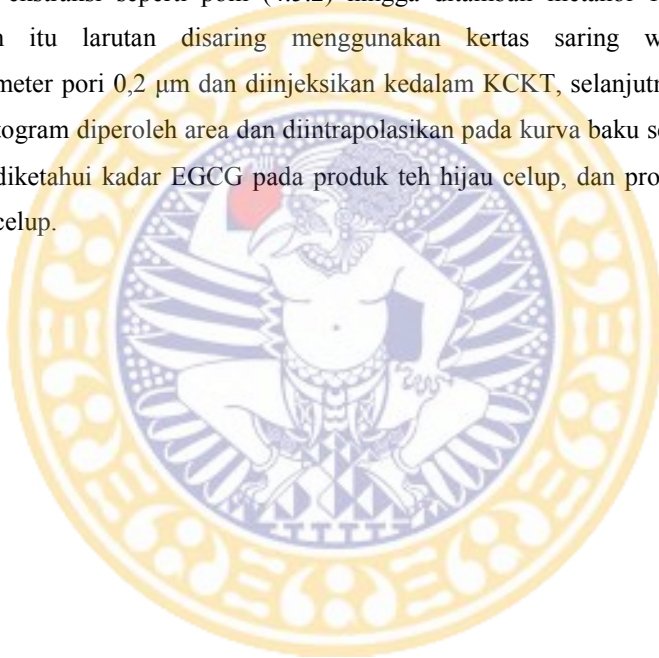
Larutan standar EGCG 40,0 µg/ml diinjeksikan pada KCKT, dieluasi dengan fase gerak terpilih sebanyak 6 kali pada hari yang berbeda kemudian dihitung nilai KV.

4.5.10 Akurasi dan Presisi Metode

Timbang secara teliti sampel produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup dengan variasi berat (2,00; 1,80; 1,60; 1,40; 1,20 dan 1,00 g) kemudian ditambahkan standar EGCG sebanyak 56,0 mg pada sampel teh hijau untuk konsentrasi 80%, 70,0 mg untuk konsentrasi 100%, dan 84,0 mg untuk konsentrasi 120%. Pada teh hitam celup ditambahkan standar EGCG sebanyak 24,0 mg untuk konsentrasi 80%, 30,0 mg untuk konsentrasi 100% dan 36,0 mg untuk konsentrasi 120%, kemudian dilakukan proses ekstraksi seperti pada poin (4.5.2) hingga ditambah metanol 10,0 ml. Setelah itu larutan disaring menggunakan kertas saring whatman berdiameter 0,2 μ m dan diinjeksikan kedalam KCKT. perbandingan kromatogram dari hasil pembacaan alat dan dihitung harga % perolehan kembali. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

4.5.11 Penetapan Kadar EGCG

Penetapan kadar EGCG pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup, dilakukan dengan menimbang produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup sebanyak 2,0 gram (penimbangan dilakukan sebanyak 5 kali) kemudian ditambahkan standar EGCG sebanyak 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0 mg ke masing-masing sampel, kemudian dilakukan proses ekstraksi seperti poin (4.5.2) hingga ditambah metanol 10,0 ml. Setelah itu larutan disaring menggunakan kertas saring whatman berdiameter pori 0,2 μm dan diinjeksikan kedalam KCKT, selanjutnya dari kromatogram diperoleh area dan diintrapolasikan pada kurva baku sehingga dapat diketahui kadar EGCG pada produk teh hijau celup, dan produk teh hitam celup.



BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup berdasarkan metode gravimetri sesuai dengan Farmakope Indonesia V Tahun 2014. Hasil penetapan kadar air pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel V.1 Kadar Air Produk Teh Hijau Celup

	replikasi 1	replikasi 2	replikasi 3
Berat Sampel	10,0424 g	10,0232 g	10,0229g
Berat Cawan:			
5 jam pertama	39,1483 g	42,7165 g	41,8817 g
1 jam berikutnya	39,1480 g	42,7164 g	41,8814 g
Berat Cawan + sampel			
5 jam pertama	48,4131 g	51,9997 g	51,4936 g
1 jam berikutnya	48,4012 g	51,9822 g	51,1884 g
1 jam berikutnya	48,4011 g	51,9820 g	51,1882 g
Berat Sampel Kering	9,2531 g	9,2656 g	9,3068 g
% kadar air	7,8587%	7,5585%	7,1426%
Rerata kadar air	7,5199 ± 0,3596 %		

Tabel V.2 Kadar Air Pada Produk Teh Hitam Celup

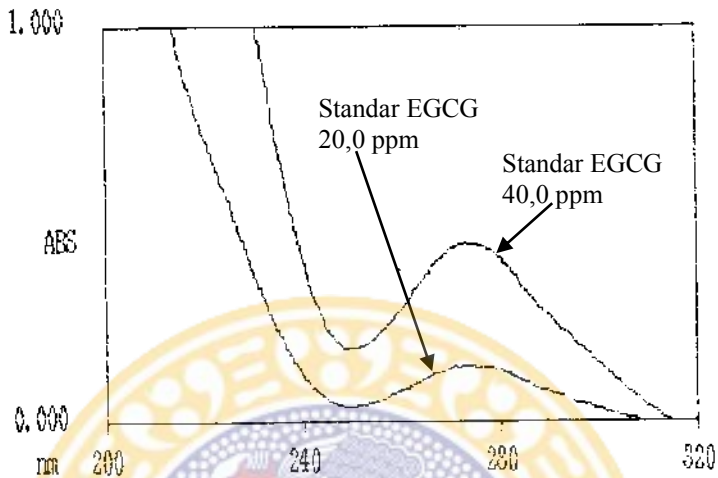
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
Berat Sampel	10,0135 g	10,0150 g	47,9992 g
Berat Cawan:			
5 jam pertama	33,4744 g	39,0216 g	37,9986 g
1 jam berikutnya	33,4738 g	39,0212 g	37,9982 g
Berat Cawan + sampel			
5 jam pertama	43,4873 g	49,0362 g	47,9992 g
1 jam berikutnya	42,5536 g	48,2288 g	47,3038 g
1 jam berikutnya	42,5389 g	48,3133 g	47,2926 g
Berat Sampel Kering	9,0651 g	9,2921 g	9,2944 g
% kadar air	*9,4712 %	7,2182 %	7,0653 %
Rerata kadar air	7,1418 ± 0,1081 %		

* Data *direject* dengan rumus $2,5 \text{ SD}$
(Underwood, 1991)

5.2 Optimasi Kondisi KCKT

5.2.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan pengamatan terhadap serapan larutan standar EGCG pada dua konsentrasi yang berbeda yaitu pada konsentrasi 20,0 ppm dan 40,0 ppm dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada λ 200,0-360,0 nm. Dari hasil pengamatan diperoleh panjang gelombang maksimum untuk EGCG yaitu 274,0 nm yang selanjutnya digunakan untuk analisis kadar EGCG dalam produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup.



Gambar 5.1 Spektra larutan standar EGCG 20,0 ppm dan 40,0 ppm dalam pelarut metanol

5.2.2 Kondisi KCKT

Pada penelitian kali ini digunakan KCKT Agilent 1100 *series* untuk penentuan kadar EGCG pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang diseduh berulang.

Tabel V.3 Kondisi KCKT terpilih pada penentuan kadar EGCG pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang diseduh berulang.

Parameter	Kondisi
Fase Gerak	metanol : air : asam asetat 2% (20:75:5) (pH = 4)
Aliran Fase Gerak	1,0 ml / menit
Kolom	RP C-18 μ bondapak 10 μ m, 3.9 x 300 mm
Panjang Gelombang	274,0 nm
Suhu	30 °C
Detector	<i>Diode Array Detector</i>
Volume injek	10,0 μ L

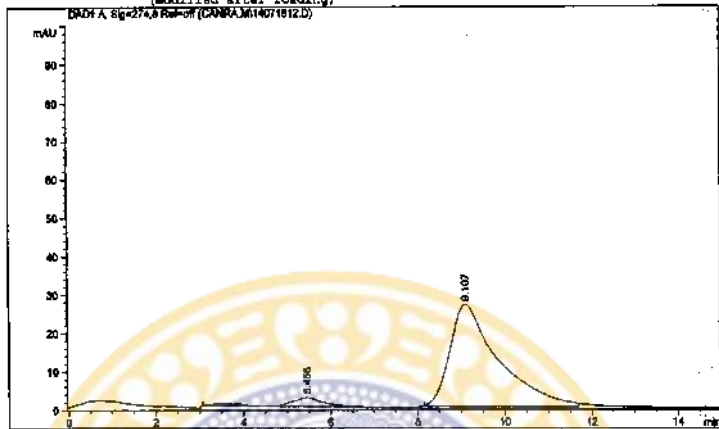
5.3 Validasi Metode

5.3.1 Penentuan Selektivitas

Uji selektivitas dilakukan pada sampel produk teh hijau celup, produk teh hitam celup dan standar EGCG untuk mendapatkan fase gerak terpilih yang selanjutnya digunakan dalam analisis. Fase gerak terpilih adalah fase gerak yang dapat memisahkan EGCG dengan senyawa lain dengan baik dengan nilai derajat resolusi (R_s) $\geq 1,5$. Fase gerak yang terpilih untuk analisis adalah metanol : air: asam asetat 2% v/v (20:75:5 v/v/v). Pada uji selektivitas dilakukan *overlay* kromatogram dari sampel teh hijau celup, standart EGCG, sampel teh hijau celup yang telah ditambahkan dengan standart, dan juga dilakukan pada sampel produk teh hitam celup.



Gambar 5.2 Kromatogram sampel produk teh hijau celup dalam pelarut metanol-air-asam asetat 2% v/v (75-20-5) menggunakan KCKT detektor diode array



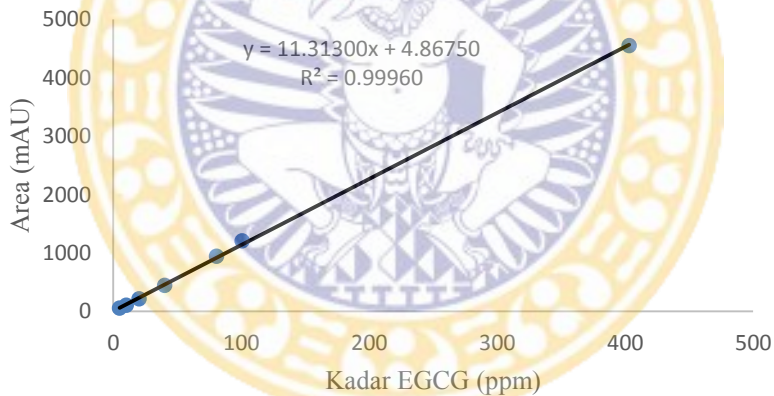
Gambar 5.3 Kromatogram sampel produk teh hitam celup dalam pelarut metanol-air-asam asetat 2% v/v (75-20-5) menggunakan KCKT detektor diode array

5.3.2 Linearitas

Linearitas ditentukan dengan membuat serangkaian larutan baku EGCG 5,0 ppm, 10,0 ppm, 20,0 ppm, 40,0 ppm, 80,0 ppm, 100,0 dan 400,0 ppm yang kemudian diinjeksikan ke KCKT, kemudian masing-masing diamati areanya yang selanjutnya dibuat persamaan regresi.

Tabel V.4 linearitas standar EGCG

Kadar (ppm)	Area (mAU)
5,04	53,90896
10,08	103,44984
20,16	209,41495
40,32	440,50894
80,64	941,64746
100,80	1204,01404
403,20	4550,29395
$y = 11,31300 x + 4,86750$	
$r = 0,99980$	
$V_{xo} = 3,20250 \%$	



Gambar 5.4 Linearitas standar EGCG

Dari hasil uji linearitas diperoleh persamaan regresi $y = 11,31300 x + 4,86750$ dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,99980 untuk $n \geq 6$ dan nilai $V_{xo} = 3,20250\%$. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang linear antara konsentrasi standar EGCG dengan area sehingga persamaan

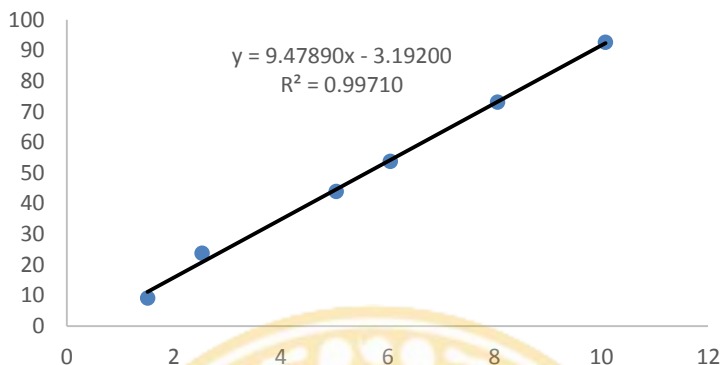
linearitas tersebut dapat digunakan untuk penetapan kadar EGCG pada masing – masing sampel.

5.3.2 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dilakukan dengan menyuntikkan konsentrasi EGCG 0,1; 0,25; 0,50; 1,00; 1,51; 2,53; 5,04 ; 6,05 ; 8,06 ; 10,0 ppm pada kondisi KCKT terpilih.

Tabel V.5 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

x (ppm)	y (mAU)
0,10	0,00000
0,25	0,00000
0,50	0,00000
1,00	0,00000
1,51	9,10432
2,53	23,78789
5,04	43,92984
6,05	53,71515
8,06	73,09016
10,08	92,59032
$Y = 9,47890x - 3,19200$	
$r = 0,99860$	
$SD = 1,85370$	
$LOD = 0,58670 \text{ ppm}$	
$LOQ = 1,95560 \text{ ppm}$	



Gambar 5.5 Linearitas standar EGCG

Dari perhitungan maka diperoleh nilai LOD sebesar 0,58670 ppm dan nilai LOQ sebesar 1,95560 ppm.

5.3.4 Presisi

Penentuan presisi dilakukan dengan membuat larutan baku EGCG dengan konsentrasi 40,0 ppm sebanyak 6 kali pada alat yang sama, analisis yang sama, dan juga waktu yang berdekatan. Metode dikatakan presisi jika harga $KV < 2\%$ untuk $n \geq 6$ (Yuwono and Indrayanto, 2005).

Tabel V.6 Presisi *Intraday*

Penyuntikan ke-	Area (mAU)
1	437,86566
2	434,26309
3	434,81082
4	434,00446
5	433,31778
6	431,69479
X	434,32610
SD	2,04016
% KV	0,46973

Dari hasil perhitungan didapatkan nilai KV sebesar 0,46973%. Nilai tersebut telah memenuhi syarat presisi dimana nilai $KV < 2\%$ sehingga dapat dikatakan metode tersebut memenuhi parameter validasi.

5.3.4.1 Presisi *Interday*

Presisi interday dilakukan dengan menyuntikkan larutan baku EGCG 40,0 ppm sebanyak 6 kali pada tiga hari yang berbeda. Hari yang dipilih untuk menentukan presisi interday yaitu pada hari pertama, keempat, dan kelima.

Tabel V.7 Presisi *Interday*

Hari ke-1		Hari ke-4		Hari ke-5	
Penyuntikkan ke-	Area EGCG (mAU)	Penyuntikkan ke-	Area EGCG (mAU)	Penyuntikkan ke-	Area EGCG (mAU)
1	438,05338	1	442,74854	1	385,34195
2	435,92905	2	439,36591	2	381,55490
3	436,82855	3	442,19495	3	382,86658
4	437,54294	4	445,51160	4	379,66815
5	440,67212	5	448,48264	5	381,12350
6	439,27777	6	442,40756	6	379,42511
X	438,05064	X	443,45187	X	381,66337
SD	1,71058	SD	3,14360	SD	2,20334
% KV	0,39049	% KV	0,70889	% KV	0,57730

Nilai KV untuk presisi interday = 0,55890% sehingga dapat dikatakan telah memenuhi syarat $KV < 2$ untuk $n \geq 6$ (Yuwono and Indrayanto, 2005).

5.3.5 Akurasi

Penentuan akurasi dilakukan dengan menambahkan standar EGCG dengan konsentrasi antara 80-120%. Pada produk teh hijau celup ditambahkan standar EGCG dengan berat 56,0 mg untuk konsentrasi 80%, 70,0 mg untuk konsentrasi 100%, dan 84,0 mg untuk konsentrasi

120%. Penambahan standar EGCG pada produk teh hitam celup dilakukan dengan berat 24,0 mg untuk konsentrasi 80%, 30,0 mg untuk konsentrasi 100%, dan 36,0 mg untuk konsentrasi 120%, kemudian campuran sampel dan standar dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar sebenarnya).

Tabel V.8 Akurasi EGCG pada sampel produk teh hijau celup

% Konsentrasi	Standar EGCG yang ditambahkan (mg)	Konsentrasi EGCG yang terdeteksi (mg)	% Recovery
80%	56,0	21,6	89,7
	56,0	24,8	102,7
	56,0	23,8	95,7
		$\bar{X} \pm SD$	96,0 \pm 6,7
100%	30,2	24,5	81,0
	30,1	27,9	92,8
	30,0	25,9	86,3
		$\bar{X} \pm SD$	86,7 \pm 5,8
120%	36,2	32,5	89,7
	36,1	34,9	96,6
	36,2	34,1	94,0
		$\bar{X} \pm SD$	93,1 \pm 3,4
		Total $\bar{X} \pm SD$	90,2 \pm 2,3
% KV			0,1

Tabel V.9 Akurasi EGCG pada sampel produk teh hitam celup

% Konsentrasi	Standar EGCG yang ditambahkan (mg)	Konsentrasi EGCG yang terdeteksi (mg)	% Recovery
80%	24,1	21,6	89,7
	24,2	24,8	102,7
	24,3	23,8	95,7
$\bar{X} \pm SD$			96,0 \pm 6,7
100%	30,2	24,5	81,0
	30,1	27,9	92,8
	30,0	25,9	86,3
$\bar{X} \pm SD$			86,7 \pm 5,8
120%	36,2	32,5	89,7
	36,1	34,9	96,6
	36,2	34,1	94,0
$\bar{X} \pm SD$			93,1 \pm 3,4
Total $\bar{X} \pm SD$			91,8 \pm 4,9
%KV			0,1

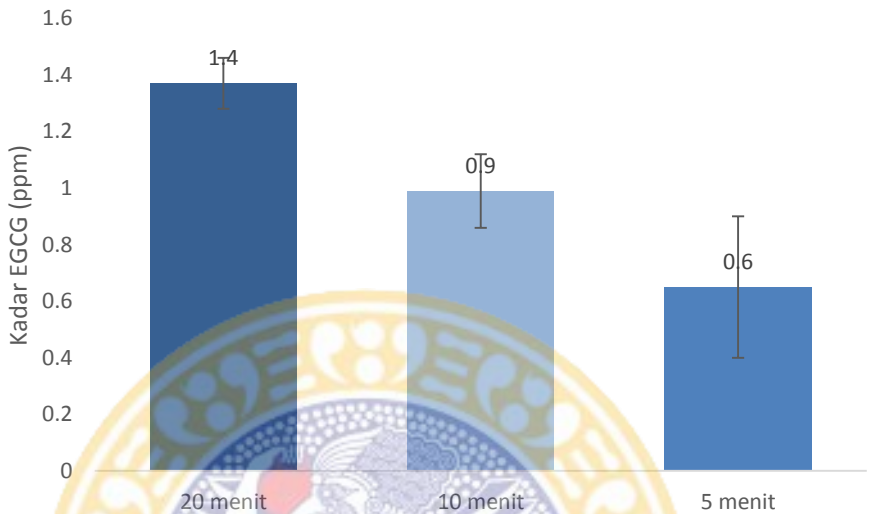
Berdasarkan tabel V.8 dan tabel V.9 didapatkan hasil perhitungan persen perolehan kembali untuk produk teh hijau celup sebesar 90,2 \pm 2,3% dan nilai KV sebesar 0,1%. Pada produk teh hitam celup persen perolehan kembali sebesar 91,3 \pm 4,9% dengan nilai KV sebesar 0,1%. Dapat dikatakan metode ini memenuhi persyaratan dimana untuk sampel bioanalisis nilai perolehan kembali yang diterima adalah 80-120% dan nilai KV < 2% (Wang *et al.*, 2005).

5.5 Penetapan Kadar

Penetapan kadar EGCG dilakukan pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang diseduh berulang sebanyak 3 kali dengan waktu 5 menit, diseduh 1 kali dengan waktu 10 menit, dan diseduh 1 kali pada waktu 20 menit, Kadar EGCG diperoleh dengan menyuntikkan sampel ke KCKT dengan kondisi terpilih, kemudian area yang dihasilkan diinterpretasikan ke dalam persamaan kurva baku, Hasil pengolahan data penetapan kadar EGCG dapat dilihat pada tabel V.9 dan tabel V.10

Tabel V.10 Pengaruh waktu penyeduhan terhadap kadar EGCG pada produk teh hijau celup

Sampel	Replikasi	% (b/b)
Penyeduhan selama 20 menit	1	1,3
	2	1,4
	3	1,5
	$\bar{X} \pm SD$	$1,4 \pm 0,1$
Penyeduhan selama 10 menit	1	0,9
	2	1,2
	3	0,9
	$\bar{X} \pm SD$	$0,9 \pm 0,1$
Penyeduhan pertama selama 5 menit	1	0,6
	2	0,9
	3	0,4
	$\bar{X} \pm SD$	$0,6 \pm 0,3$

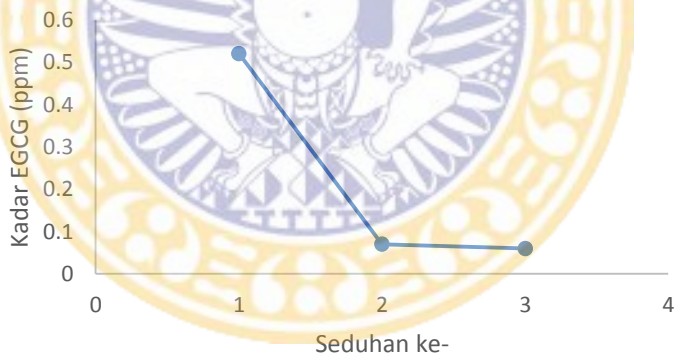


Gambar 5.6 Diagram batang pengaruh waktu penyeduhan terhadap kadar EGCG pada produk teh hijau celup

Dari tabel V.10 dan gambar 5.6 dapat dilihat bahwa kadar EGCG terbanyak terdapat pada produk teh hijau celup yang diseduh selama 20 menit yaitu sebesar $1,4 \pm 0,1\%$ (b/b). Pada produk teh hijau celup yang diseduh selama 10 menit kandungan EGCG yang terdapat di dalamnya yaitu sebesar $0,9 \pm 0,1 \%$ (b/b) dan pada produk teh hijau celup yang diseduh dengan waktu 5 menit kandungan EGCG di dalamnya adalah sebesar $0,6 \pm 0,2\%$ (b/b).

Tabel V.11 Pengaruh penyeduhan berulang terhadap kadar EGCG pada produk teh hijau celup

Penyeduhan pertama selama 5 menit	1	0,6
	2	0,9
	3	0,4
	$\bar{X} \pm SD$	$0,6 \pm 0,2$
Penyeduhan kedua selama 5 menit	1	0,2
	2	0,1
	3	0,1
	$\bar{X} \pm SD$	$0,1 \pm 0,1$
Penyeduhan ketiga selama 5 menit	1	0,1
	2	0,1
	3	0,1
	$\bar{X} \pm SD$	$0,1 \pm 0,0$



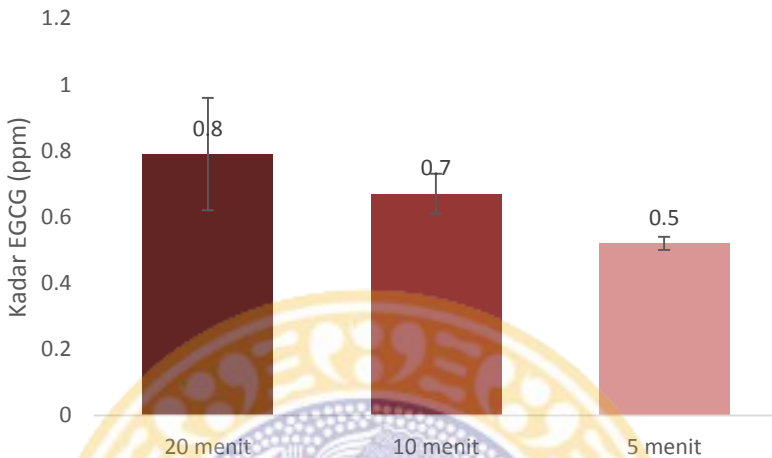
Gambar 5.7 Penentuan kadar EGCG pada penyeduhan berulang produk teh hijau celup

Dari tabel V.11 dan gambar 5.7 dapat dilihat bahwa penyeduhan berulang pada produk teh hijau celup akan mempengaruhi kadar EGCG

yang terkandung di dalamnya, dimana terdapat penurunan kandungan EGCG pada seduhan kedua dan ketiga.

Tabel V.12 Pengaruh waktu penyeduhan terhadap kadar EGCG pada produk teh hitam celup

Sampel	Replikasi	% (b/b)
Penyeduhan selama 20 menit	1	0,9
	2	0,9
	3	0,6
	$\overline{X} \pm SD$	$0,8 \pm 0,2$
Penyeduhan selama 10 menit	1	0,7
	2	0,6
	3	0,7
	$\overline{X} \pm SD$	$0,7 \pm 0,1$
Penyeduhan pertama selama 5 menit	1	0,5
	2	0,5
	3	0,5
	$\overline{X} \pm SD$	$0,5 \pm 0,0$

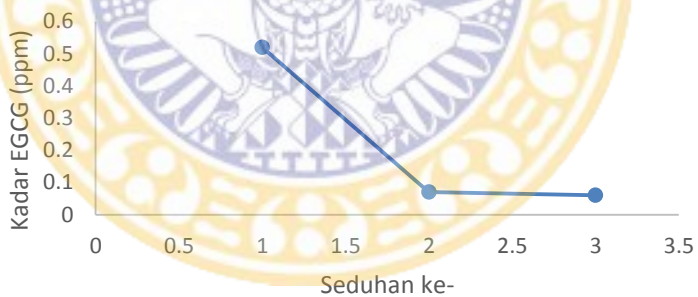


Gambar 5.8 Diagram batang pengaruh waktu penyeduhan terhadap kadar EGCG pada produk teh hitam celup

Dari tabel V.12 dan gambar 5.8 dapat dilihat bahwa kadar EGCG terbanyak terdapat pada produk teh hitam celup yang diseduh selama 20 menit yaitu sebesar $0,8 \pm 0,2$ % (b/b). Pada produk teh hitam celup yang diseduh selama 10 menit kandungan EGCG yang terdapat di dalamnya yaitu sebesar $0,7 \pm 0,1$ % (b/b) dan pada produk teh hitam celup yang diseduh dengan waktu 5 menit kandungan EGCG di dalamnya adalah sebesar $0,5 \pm 0,0$ % (b/b).

Tabel V.13 Pengaruh penyeduhan berulang terhadap kadar EGCG pada produk teh hitam celup

Penyeduhan pertama selama 5 menit	1	0,5
	2	0,5
	3	0,5
	$\bar{X} \pm SD$	$0,5 \pm 0,0$
Penyeduhan kedua selama 5 menit	1	0,1
	2	0,1
	3	0,1
	$\bar{X} \pm SD$	$0,1 \pm 0,0$
Penyeduhan ketiga selama 5 menit	1	0,1
	2	0,1
	3	0,1
	$\bar{X} \pm SD$	$0,1 \pm 0,0$



Gambar 5.9 Penentuan kadar EGCG pada penyeduhan berulang produk teh hitam celup

Dari tabel V.13 dan gambar 5.9 dapat dilihat bahwa penyeduhan berulang pada produk teh hitam celup akan mempengaruhi kadar EGCG

yang terkandung di dalamnya, dimana terdapat penurunan kandungan EGCG pada seduhan kedua dan ketiga.

5.5 Analisis Statistika

Tabel V.14 Analisis anova satu arah pada produk teh hijau celup

(I) Penyeduhan	(J) Penyeduhan	<i>Difference mean</i>	Sig
Penyeduhan 20	Penyeduhan 10	.37667*	.042
	Penyeduhan 5.1	.72000*	.001
	Penyeduhan 5.2	1.22000*	.000
	Penyeduhan 5.3	1.31000*	.000
Penyeduhan 10	Penyeduhan 20	-.37667*	.042
	Penyeduhan 5.1	.34333	.068
	Penyeduhan 5.2	.84333	.000
	Penyeduhan 5.3	.93333	.000
Penyeduhan 5.1	Penyeduhan 20	-.72000*	.001
	Penyeduhan 10	-.34333	.068
	Penyeduhan 5.2	.50000	.008
	Penyeduhan 5.3	.59000	.002
Penyeduhan 5.2	Penyeduhan 20	-1.22000*	.000
	Penyeduhan 10	-.84333	.000
	Penyeduhan 5.1	-.50000	.008
	Penyeduhan 5.3	-.09000	.921
Penyeduhan 5.3	Penyeduhan 20	-1.31000*	.000
	Penyeduhan 10	-.93333	.000
	Penyeduhan 5.1	-.59000	.002
	Penyeduhan 5.2	-.09000	.921

Dari tabel V.14 hasil analisis statistika ANOVA satu arah dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) didapatkan nilai sig, apabila nilai sig < 0,05 maka terdapat perbedaan bermakna pada kadar EGCG dalam produk teh hijau celup terhadap waktu penyeduhan. Dari tabel dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara penyeduhan produk teh hijau celup pada waktu 20 menit dengan penyeduhan produk teh hijau celup dengan waktu 10 menit dan 5 menit karena nilai sig $0,042 < 0,050$ terhadap penyeduhan produk teh hijau celup dengan waktu 10 menit, dan

nilai sig $0,001 < 0,050$ terhadap penyeduhan produk teh hijau celup dengan suhu 5 menit.

Pada penyeduhan produk teh hijau celup yang dilakukan berulang terdapat perbedaan bermakna pada kadar yang terkandung pada seduhan teh pertama dan kedua karena nilai sig $< 0,05$, sedangkan pada seduhan teh kedua dan ketiga tidak terdapat perbedaan yang bermakna karena nilai sig $> 0,05$.

Tabel V.15 Analisis anova satu arah pada produk teh hitam celup

(I) Penyeduhan	(J) Penyeduhan	<i>Difference mean</i>	Sig
Penyeduhan 20	Penyeduhan 10	.13000	.344
	Penyeduhan 5.1	.28000	.011
	Penyeduhan 5.2	.72667	.000
	Penyeduhan 5.3	.73667	.000
Penyeduhan 10	Penyeduhan 20	-.13000	.344
	Penyeduhan 5.1	.15000	.229
	Penyeduhan 5.2	.59667	.000
	Penyeduhan 5.3	.60667	.000
Penyeduhan 5.1	Penyeduhan 20	-.28000	.011
	Penyeduhan 10	-.15000	.229
	Penyeduhan 5.2	.44667	.000
	Penyeduhan 5.3	.45667	.000
Penyeduhan 5.2	Penyeduhan 20	-.72667	.000
	Penyeduhan 10	-.59667	.000
	Penyeduhan 5.1	-.44667	.000
	Penyeduhan 5.3	.01000	1.000
Penyeduhan 5.3	Penyeduhan 20	-.73667	.000
	Penyeduhan 10	-.60667	.000
	Penyeduhan 5.1	-.45667	.000
	Penyeduhan 5.2	-.01000	1.000

Dari tabel V.15 hasil analisa statistika ANOVA satu arah dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) didapatkan nilai sig, apabila nilai sig $< 0,05$ maka terdapat perbedaan bermakna pada kadar EGCG dalam produk teh hitam celup terhadap waktu penyeduhan. Dari tabel dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara penyeduhan produk teh hijau celup pada waktu 20 menit dengan penyeduhan produk teh hijau

celup dengan waktu 10 menit karena nilai sig $0,344 > 0,050$, Terdapat perbedaan yang bermakna antara peyeduhan produk teh hitam celup dengan waktu 20 menit terhadap produk teh hitam celup yang diseduh dengan waktu 5 karena nilai sig $0,011 < 0,050$.

Pada penyeduhan produk teh hitam celup yang dilakukan berulang terdapat perbedaan bermakna pada kadar yang terkandung pada seduhan teh pertama dan kedua karena nilai sig $< 0,05$, sedangkan pada seduhan kedua dan ketiga tidak terdapat perbedaan yang bermakna karena nilai sig $> 0,05$.



BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk menentukan kadar epigalokatekin galat (EGCG) pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang diseduh berulang dengan metode KCKT. Penyeduhan berulang yang dilakukan menggunakan sampel yang sama yang diseduh berulang sebanyak tiga kali. Metode KCKT dipilih untuk menentukan kadar EGCG pada penelitian ini karena sampel yang digunakan merupakan sampel biologis yang memiliki kandungan lebih dari satu senyawa. Sampel yang digunakan adalah produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang beredar di Surabaya.

Pada penelitian ini terlebih dahulu dilakukan penetapan kadar air yang terdapat dalam produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup. Tujuan penetapan kadar air adalah untuk mendapatkan berat konstan, menghilangkan variasi air yang dapat mempengaruhi konsentrasi EGCG di dalam produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup. Penetapan kadar air pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup menggunakan metode gravimetri dengan hasil kadar air yang terdapat dalam produk teh hijau celup sebesar $7,51990 \pm 0,35900$ %. Hasil kadar air pada produk teh hitam celup adalah sebesar $7,14180 \pm 0,10810$ %, sedangkan menurut penelitian (Rachman, 2015) didapatkan kadar air pada produk teh hijau celup sebesar $8,46000 \pm 0,19010$ % dan pada produk teh hitam celup sebesar $7,93000 \pm 0,02120$ %. Perbedaan kadar air yang ada pada penelitian ini dengan penelitian lain dikarenakan perbedaan tempat memperoleh sampel karena kadar air dalam sampel dapat dipengaruhi oleh lingkungan seperti curah hujan.

Pada penelitian ini dilakukan optimasi kondisi KCKT dan validasi metode. Validasi metode dilakukan sebelum penentuan kadar EGCG pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang diseduh berulang. Jenis parameter yang diuji dilakukan tergantung pada kategori analisisnya. (USP XXXVII, 2014). Penentuan kadar EGCG termasuk kedalam kategori I. Validasi metode yang dilakukan pada penelitian ini adalah penentuan selektivitas, akurasi, linieritas, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi.

Penentuan panjang gelombang dilakukan untuk mendapatkan panjang gelombang maksimum yang akan digunakan untuk analisis. Penentuan panjang gelombang dilakukan dengan alat spektrofotometer UV Vis lamda EZ201. Pada penentuan panjang gelombang maksimum didapatkan hasil sebesar 274,0 nm, panjang gelombang ini sama dengan literatur (Purwanto *et al.*, 2010) yang mendapatkan nilai panjang gelombang maksimum sebesar 274,0 nm.

Optimasi kondisi KCKT dilakukan untuk mendapatkan kondisi KCKT terpilih. Pada penelitian ini kondisi KCKT yang digunakan untuk analisis adalah dengan fase gerak metanol : air : asam asetat 2% v/v pH = 4, sebanyak 20:75:5 v/v/v dengan laju alir 1,00 ml/menit dengan kolom *mikrobondapack* dengan suhu 30°C, dari kondisi ini didapatkan nilai derajat keterpisahan > 1,5 dan faktor selektivitas > 1. Pada penelitian ini nilai R_s untuk produk teh hijau celup sebesar 2,52 dan pada produk teh hitam celup sebesar 2,13. Pada penelitian (Purwanto *et al.*, 2010) digunakan kondisi KCKT yang sama dengan penelitian ini didapatkan nilai R_s sebesar 2,85 pada teh hijau. Perbedaan nilai resolusi yang didapat dipengaruhi oleh kejenuhan kolom. Kejenuhan kolom berpengaruh terhadap pengotor yang mungkin ada di dalam kolom. Semakin jenuh suatu kolom menyebabkan

pengotornya semakin sedikit, sehingga hasil pemisahan dapat menjadi lebih baik.

Linearitas dilakukan untuk melihat kemampuan dari metode yang digunakan dalam memberikan hasil pengukuran yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada sampel (Harmita, 2004). Pada penelitian ini dilakukan uji linearitas dengan menyuntikkan 7 larutan standar EGCG dengan konsentrasi 5-400,0 ppm. Setelah didapatkan area pada kromatogram maka dibuat kurva kalibrasi yang menghubungkan antara area (y) dengan konsentrasi (x) kemudian didapat persamaan regresi dari hasil perhitungan yaitu $y = 11,31300 x + 4,86750$ dengan nilai r sebesar 0,99980, dan nilai v_{x0} 3,20250%. Hasil linearitas pada penelitian ini dapat diterima, karena nilai r yang didapat memenuhi $r > 0,999$ menurut (Ajuha & Dong, 2005). Pada penelitian yang dilakukan oleh (Martono, Y & Martono S, 2012) didapatkan nilai persamaan linearitas $y = 1,05600x - 3,21300$ dengan nilai r sebesar 0,99970. Perbedaan hasil linearitas yang didapat pada penelitian ini dengan penelitian lain, karena perbedaan konsentrasi standar EGCG yang dibuat untuk penentuan linearitas. Konsentrasi standar EGCG yang digunakan untuk penentuan linearitas pada penelitian ini berbeda dengan penelitian lain karena konsentrasi standar yang dibuat untuk penentuan linearitas harus disesuaikan dengan kadar EGCG pada sampel. Perbedaan konsentrasi standar EGCG yang dibuat untuk penentuan linearitas berbeda karena sampel yang digunakan untuk analisis pada penelitian ini dengan penelitian lain berbeda.

Tahap validasi yang dilakukan selanjutnya adalah penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi. Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan. Sedangkan batas kuantitasi adalah kuantitas terkecil analit dalam

sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Pada penelitian ini dilakukan penyuntikan larutan standar EGCG pada konsentrasi 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 1,51; 2,53; 5,04 ; 6,05 ; 8,06 ; 10,08 ppm. Dari perhitungan didapat nilai batas deteksi sebesar 0,59 ppm dan batas kuantitasi sebesar 1,95 ppm. Pada penelitian (Martono, Y & Martono S, 2012) didapatkan nilai batas deteksi sebesar 1,00 ppm dan batas kuantitasi sebesar 1,40 ppm. Perbedaan hasil yang didapatkan karena terdapat perbedaan pada proses pelarutan standar EGCG, dimana pada penelitian yang dilakukan oleh (Martono, Y & Martono S, 2012) standar EGCG dilarutkan dalam campuran pelarut air, metanol dan asetonitril dengan perbandingan (14:7:4) v/v/v, sedangkan pada penelitian ini standar EGCG dilarutkan dalam metanol.

Tahapan validasi yang dilakukan selanjutnya adalah akurasi, yaitu kedekatan antara konsentrasi analit yang terukur dengan konsentrasi analit yang sebenarnya yang dinyatakan dalam persen perolehan kembali. Pada penentuan akurasi dilakukan dengan teknik adisi standar karena pada matriks sampel sudah terkandung senyawa EGCG. Standar EGCG yang ditambahkan adalah sebesar 80%, 100%, dan 120% dari kadar teoritis EGCG yang terkandung dalam sampel produk teh hijau celup maupun produk teh hitam celup. Sampel produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup ditimbang sebanyak 6 kali dengan variasi berat, kemudian ditambahkan standar. nilai persen perolehan kembali untuk produk teh hijau celup pada konsentrasi 80% adalah $87,50 \pm 9,48\%$, 100% adalah $91,25 \pm 6,10\%$, 120% adalah $93,10 \pm 3,37\%$. Rerata % perolehan kembali pada produk teh hijau celup adalah $90,18 \pm 2,33\%$. Untuk produk teh hitam celup didapatkan nilai persen perolehan kembali pada konsentrasi 80% adalah $96,03 \pm 6,75\%$, 100% adalah $86,73 \pm 5,84\%$, 120% adalah $93,10 \pm 3,37\%$.

Rerata nilai persen perolehan kembali pada produk teh hitam celup adalah $91,82 \pm 4,97\%$. Pada penelitian yang dilakukan oleh (Rachman,2015) nilai persen perolehan kembali yang didapatkan pada produk teh hijau celup sebesar $84,21 \pm 2,80\%$ dan pada produk teh hitam celup sebesar $88,15 \pm 3,18\%$. Perbedaan hasil perolehan kembali pada penelitian ini dengan penelitian sebelumnya karena sampel yang digunakan berbeda, selain itu karena terdapat perbedaan metode akurasi dimana pada penelitian yang dilakukan oleh (Rachman,2015) penentuan akurasi dilakukan dengan menggunakan 3 sampel untuk masing-masing konsentrasi, sedangkan pada penelitian ini digunakan 6 sampel untuk masing-masing konsentrasi. Perbedaan lain adalah proses ekstraksi, pada penelitian ini dengan penelitian tersebut terdapat perbedaan dalam proses ekstraksi dimana pada penelitian yang dilakukan (Rachman,2015) proses ekstraksi dilakukan penyeduhan selama 30 menit dengan suhu air sebesar 70°C , sedangkan pada penelitian ini waktu penyeduhan dilakukan selama 20 menit dengan suhu air yang digunakan sebesar 80°C , hal ini dapat menyebabkan kandungan EGCG pada seduhan teh berbeda, sehingga persen perolehan kembali EGCG yang ditambahkan juga berbeda. Menurut (Wang *et al.*, 2005) nilai persen perolehan kembali yang dapat diterima untuk senyawa bioanalisis adalah 80-120%, sehingga pada penelitian ini telah memenuhi persyaratan akurasi bioanalisis.

Uji yang dilakukan selanjutnya adalah uji presisi (keseksamaan). Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual rata-rata jika prosedur diterapkan berulang dari sampel yang homogen (Harmita,2004). Pada uji ini dilakukan dengan menyuntikkan larutan baku EGCG dengan konsentrasi 40,0 ppm sebanyak 6 kali. Berdasarkan hasil perhitungan

diperoleh nilai RSD 0,47%. Pada penelitian yang dilakukan oleh (Martono, Y & Martono S,2012) nilai RSD yang didapat untuk penentuan presisi adalah 0,57%. Perbedaan hasil presisi yang didapatkan karena kadar standar EGCG yang digunakan pada penelitian ini dengan penelitian yang dilakukan oleh (Martono, Y & Martono S,2012) berbeda, pada penelitian tersebut digunakan 3 konsentrasi standar EGC yang berbeda yaitu 80,0 ppm, 100,0 ppm dan 120,0 ppm. Uji presisi pada penelitian ini dapat diterima, menurut (Ermer & Miller, 2005) nilai RSD yang dapat diterima jika RSD dari pengujian $\leq 2,00$.

Setelah semua parameter validasi memenuhi persyaratan, dapat dikatakan metode penelitian ini valid, sehingga dapat digunakan untuk menentukan kadar EGCG pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup yang diseduh berulang. Kadar EGCG dalam produk teh hijau celup yang diseduh selama 20 menit adalah sebesar $1,37 \pm 0,09\%$, pada penyeduhan 10 menit sebesar $0,99 \pm 0,13\%$, dan pada penyeduhan berulang pada seduhan pertama sebesar $0,65 \pm 0,25\%$, seduhan kedua sebesar $0,15 \pm 0,03\%$, seduhan ketiga sebesar $0,06 \pm 0,00\%$. Kadar EGCG dalam produk teh hitam celup yang diseduh selama 20 menit adalah sebesar $0,79 \pm 0,17\%$, pada penyeduhan 10 menit sebesar $0,67 \pm 0,06\%$, dan pada penyeduhan berulang pada seduhan pertama sebesar $0,52 \pm 0,01\%$, seduhan kedua sebesar $0,07 \pm 0,01\%$, dan pada seduhan ketiga sebesar $0,06 \pm 0,00$. Menurut penelitian (Rachman, 2015) kadar EGCG pada produk teh hijau celup yang diperoleh dari perkebunan Lawang Malang sebesar $3,26 \pm 0,06\%$ dan pada produk teh hitam celup sebesar $1,46 \pm 0,01\%$. Perbedaan kadar EGCG yang didapat berbeda dengan penelitian yang ada karena kandungan senyawa catechin dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya kondisi lingkungan tempat tanaman teh ditanam, musim panen, dan cara

pengolahan teh di pabrik (Hara, 2001; Ho *et al.*, 2008). Selain faktor tersebut, perbedaan hasil yang didapat karena pada proses ekstraksi yang dilakukan pada penelitian ini dengan penelitian terdapat perbedaan dalam waktu penyeduhannya. Pada penelitian yang dilakukan oleh (Rachman, 2015) penyeduhan sampel dilakukan selama 30 menit, sedangkan pada penelitian ini penyeduhan dilakukan pada waktu 10 menit, 20 menit, dan juga berulang dengan waktu 5 menit.

Pada produk teh hitam celup kandungan EGCG yang didapatkan lebih sedikit dibandingkan dengan kandungan EGCG yang terdapat pada produk teh hijau celup dikarenakan proses pengolahan teh segar menjadi teh hitam. Pada proses pengolahan teh hitam, teh mengalami proses fermentasi oksidatif. Pada proses ini, senyawa catechin dan turunannya yaitu EGCG akan teroksidasi oleh udara yang dikatalisis oleh polifenol oksidase. Fermentasi oksidatif ini akan menghasilkan senyawa *theaflavin* dan *thearubigin* (Zhen, 2002).

Hasil penentuan kadar EGCG pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup kemudian dianalisis dengan menggunakan SPSS untuk dilakukan uji ANOVA satu arah. Pada hasil analisis *one way* ANOVA dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara penyeduhan produk teh hijau celup pada waktu 20 menit dengan penyeduhan produk teh hijau celup dengan waktu 10 menit dan 5 menit karena nilai $\text{sig } 0,042 < 0,050$ terhadap penyeduhan produk teh hijau celup dengan waktu 10 menit, dan nilai $\text{sig } 0,001 < 0,050$ terhadap penyeduhan produk teh hijau celup dengan suhu 5 menit. Hal ini menandakan bahwa terdapat hubungan antara waktu penyeduhan dan penyeduhan berulang terhadap kadar EGCG dalam produk teh hijau celup.

Pada penyeduhan produk teh hijau celup yang dilakukan berulang terdapat perbedaan bermakna pada kadar yang terkandung pada seduhan teh pertama dan kedua karena nilai $\text{sig} < 0,05$, sedangkan pada seduhan teh kedua dan ketiga tidak terdapat perbedaan yang bermakna karena nilai $\text{sig} > 0,05$. Hal ini menandakan bahwa terdapat hubungan antara waktu penyeduhan dan penyeduhan berulang terhadap kadar EGCG dalam produk teh hijau celup.

Pada produk teh hitam celup dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara penyeduhan produk teh hijau celup pada waktu 20 menit dengan penyeduhan produk teh hijau celup dengan waktu 10 menit karena nilai $\text{sig} 0,344 > 0,050$. Terdapat perbedaan yang bermakna antara penyeduhan produk teh hitam celup dengan waktu 20 menit terhadap produk teh hitam celup yang diseduh dengan waktu 5 karena nilai $\text{sig} 0,011 < 0,050$.

Pada penyeduhan produk teh hitam celup yang dilakukan berulang terdapat perbedaan bermakna pada kadar yang terkandung pada seduhan teh pertama dan kedua karena nilai $\text{sig} < 0,05$, sedangkan pada seduhan kedua dan ketiga tidak terdapat perbedaan yang bermakna karena nilai $\text{sig} > 0,05$. Hal ini menandakan bahwa terdapat hubungan antara waktu penyeduhan dan penyeduhan berulang terhadap kadar EGCG dalam produk teh hitam celup.

BAB VII

KESIMPULAN

7.1 Kesimpulan

- a. Metode validasi KCKT yang digunakan untuk penentuan kadar EGCG pada produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup memenuhi persyaratan validasi
- b. Kadar EGCG pada produk teh hijau celup yang diseduh berulang paling tinggi pada seduhan pertama yaitu $0,6 \pm 0,3\%$, pada seduhan kedua $0,1 \pm 0,0 \%$, pada seduhan ketiga $0,1 \pm 0,0\%$. dan kadar EGCG pada produk teh hitam celup yang diseduh berulang paling tinggi pada seduhan pertama yaitu $0,5 \pm 0,0 \%$, pada seduhan kedua $0,1 \pm 0,0 \%$ dan pada seduhan ketiga $0,1 \pm 0,0\%$

7.2 Saran

Untuk mendapatkan kandungan EGCG yang tinggi, penyeduhan produk teh hijau celup dan produk teh hitam celup sebaiknya dilakukan sekali.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, R.P 2006. Pengaruh Faktor Internal Konsumen dan Kinerja Bauran Pemasaran Terhadap Keputusan Pembelian Komoditas Teh oleh Konsumen Rumah Tangga di Provinsi Jawa Barat (disertasi). Bandung : Universitas Padjadjaran.
- Ahmed,S., Stepp, J., R., 2013. Pu-erh Tea: Botany, Production, and Chemistry. Gainesville : University Of Florida
- Ahuja, S. dan Dong, M.W. (2005). Hand Book of Pharmaceutical Analysis By HPLC, Volume 6, Separation Science and Technology, **Elsevier Inc.**, London.
- Atmojo, E.D.,2012. Analisis Sikap dan Kepuasan Konsumen Terhadap Teh Celup Merek Sarimurni. Skripsi. Bogor : Fakultas Ekonomi dan Manajemen, Institut Pertanian Bogor
- Bansal,V., Malviya,R., Pal,O.P., Sharma,P.K., 2010. High Performance Liquid Chromatography:A Short Review. **Journal of Global Pharma Technology**, 2(5):22-26
- Bhattacharyya,N., Seth,S., Tudu,B., Tamuly, P., Jana,A., Ghosh,D., Bandyopadhyay,R., Bhuyan,M., 2007. Monitoring of Black Tea Fermentation Process Using Electronic Nose. **Journal of Food Engineering**, 80:1146-1156
- Budavari, S. 1996. **The Merck Index an Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biological**. 12th Edition, Merck & Co., Inc., p595
- Cabrere,C., Artacho,R., Gimenez,R., 2006. Beneficial Effects of Green Tea : a Review. **Journal of American College of Nutrition**, 25(2): 79-99
- Chacko, S.M., Thambi, P.T., Kuttan,R.,Nishigaki, I., 2010. Beneficial Effect of Green Tea: A Literature Review. Nagoya, 5:13

- Das,S., Tanwar,J., Hameed,S., Fatima,Z., 2014. Antimicrobial Potential of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): A Green Tea Polyphenol. **Jurnal of Biochemical and Pharmacological Research**, 2(3):167-174
- Dias,T.R., Tomas, G., Teixeira,N.F., Alves,M.G., Oliveira, P.F., Silva, B.M.,2013. White Tea (Camellia Sinensis (L.)): Antioxidant Properties and Benefical Health Effects. **International Journal of Food Science, Nutrition and Dietics**, 2(2):19-26
- Ditjen POM. (2000). **Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Cetakan Pertama**. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Ermer, J. dan Miller, H.M. 2005. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide To Best Practice. **Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KgaA**. Weinheim
- Gandjar, I.G., & Rohman, A., 2008. Kimia Farmasi Analisis. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Green,R.J., 2005. **Impacts of Green Tea Formulation on Measures of Tea Catechin Bioavailability**. Perdue University Graduate School
- Harmita, 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungannya. **Majalah Ilmu Kefarmasian**, 1(3):117 – 135.
- Hilal,Y., Engelhardt, U., 2007. Characterisation Of White Tea-Comparison To Green Tea And Black Tea. **Journal of Consumer Protection and food Safety**, 2 : 414-421
- Kupeic,T., 2004. Quality Control Analytical Methods: High Performance Liquid Chromatography. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, 8(3) : 223-227
- Long, G., Handa,S.S., Khanuja, S.P.S., Rakesh, D.D., 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology
- Lv,H.P., Zhang,Y.J., Lin,Z., Liang,Y.R., 2013. Processing and Chemical Constituents Of Pu-erh Tea: A Review. **Food Research International**, 53:608-618

- Lv,S., Wu,Y., Zhou,J., Lian,M., Li,C., Xu,Y., Liu,S., Wang,C., Meng,Q., 2014. The Study of Finger Print Characteristics of Dayi Pu-Erh Tea Using a Fully Automatic HS-SPME/GC-MS and Combined Chemometrics Methods. **Plos One**, 9(12) : e116428
- Martono Y., Martono, S., 2012. Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi untuk Penetapan Kadar Asam Galat, Kafein, Dan Epigallocatekin Galat Pada Beberapa Produk Teh Celup. **Agritech**, 32(4) : 362-368
- Mereles, D., hunstein,W., 2011. Epigallocatechin-2-Gallate (EGCG) For Clinical Trials: More Pitfalls Than Promises. **International Journal of Molecular Sciences**, 12: 5592-5603
- Mukriani, 2014.Ekstraksi,Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif, **Jurnal Kesehatan**, 7(2):361-367
- Namita, P., Mukesh, R., Vijay,K., J., 2012. Camellia sinensis (Green Tea): A Review. **Global Journal Of Pharmacology** 6(2) : 52-59
- Purwanto, D. A., Rahayu, R. P., & Puromo, T., 2010. Analysis of IFN- γ Concentration in Wistar Rat blood After Oral Administration of Standardized Green Tea Water Extract. **Indo. J. Chem.** 10(3):390-395.
- Rachman, L.D., 2010. Penetapan Kadar EGCG Menggunakan Metode KCKT Pada Daun Teh, Teh Hitam, dan Teh Hijau dari Kebun Teh Wonosari Malang. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Rusak,G., komes,D., Likic,S., Horzic,D., Kovac,M., 2008. Phenolic Content and Antioxidative Capacity of Green and White Tea Extracts. **Food Chemistry**, 110:852-858
- Saito, S.T., Welzel, A., Suyenaga,E.S., Bueno, F., 2006. A Method For Fast Determination of Epigallocatechin Gallate (EGCG), Epicatechin (EC), Catechin (C), and Caffeine (CAF) in Green Tea Using HPLC. **Campinas**, 26(2):394-400
- Schwalfenberg,G., Genius,S.,J., Odushkin, I., 2013. The Benefits and Risk of Consuming Brewed Tea : Beware of Toxic Element Contamination. **Journal Of Toxicology**, Volume 2013

- Shabir,A.G., 2004. **A Practical Approach to Validation of HPLC Methods Under Current Good Manufacturing Practice**. UK
- Sharma,V., Gulati,A., Ravndranath,S.D., Kumar,V., 2005. A Simple and Convenient Method For Analysis of Tea Biochemicals by Reverse Phase HPLC. **Palampur**
- Sugihartini,N., Fudholi,A., Pramono,S., Sismindari, 2014. Validasi Metode Analisa Penetapan Kadar Epigallocatekin Galat Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. **Pharmaciana**, 4(2):111-115
- Sundaram,H., Vijayalakshmi,N., Srilatha,K.P., 2009. High Performance Liquid Chromatography and Its Role in Identification of Mycobacteriae: An Overview.**NTI Bulletin**, 45:1-4
- Taylorson,K., 2012. The Health Benefits of Tea Varieties From *Camellia sinensis*. **The Plymouth Student Scientist**, 5(1):304-312
- Theppakorn, T., Luthfivvyah,A., Ploysri,K., 2014. Simultaneous Determination of Caffeine and 8 Catechin in Oolong Teas Produces in Thailand. **International Food Research Journal**, 21(5) : 2055-2061
- Uzunalic, A.P., Skerget,M., Knez,Z., Weinreich,B., Otto,F., Gruner,S., 2006. Extraction of Active Ingredients From Green Tea (*Camellia sinensis*) : Extraction Efficiency of Major Catechin and Caffeine. **Elsevier Food Chemistry** 96: 597-605
- Vuong,Q.V., Golding,J.B., Stathopoulos,C.E., Nguyen, M.H., Roach,P.D., 2011. Optimizing Condition for The Extraction of Catechins From Green Tea Using Hot Water. **Journal of Speration Science**, 34: 3099-3106
- Zhang, L.Z., Wang, D.L., Chen, W.X., Tan, X.D., Wang, P.C., 2012. Impact of Fermentation Degree on The Antioxidant Activity of Pu-erh Tea in vitro. **Journal Food Biochem**. 36 : 262–267
- Zhao,L., Jia,S., Tang,W., Sheng,J., Luo,Y., 2011. Pu-erh Tea Inhibits Tumor Cell Growth by Down Regulating Mutant p53. **International Journal Molecular Science**, 12(11): 7581-7593

Lampiran 1**CONTOH PERHITUNGAN KADAR AIR**

- **PERHITUNGAN KADAR AIR PRODUK TEH HIJAU CELUP**

- Menentukan berat konstan kurs kosong =

Replikasi 1	39,1483 g	
	39,1483 g	
	39,1481 g	
	39,1480 g	→ berat konstan
Replikasi 2	42,7166 g	
	42,7165 g	
	42,7164 g	
	42,7164 g	→ berat konstan
Replikasi 3	41,8817 g	
	41,8815 g	
	41,8814 g	
	41,8814 g	→ berat konstan

- Berat Teh Hijau Celup =

Replikasi 1 = 10,0424

Replikasi 2 = 10,0232

Replikasi 3 = 10,0229

- Berat Kurs + Teh Hijau Celup =

Replikasi 1	48,4018	
	48,4016	
	48,4012	
	48,4011	→ berat konstan
Replikasi 2	51,9828	
	51,9825	
	51,9822	
	51,9820	→ berat konstan
Replikasi 3	51,1889	
	51,1886	
	51,1884	
	51,1882	→ berat konstan

- Kadar Air pada produk teh hijau celup =

$$\text{Replikasi 1} = \frac{10,0424 - (48,4011 - 39,10)}{10,0424} \times 100\% = 7,8587\%$$

$$\text{Replikasi 2} = \frac{10,0232 - (51,9820 - 42,7164)}{10,0232} \times 100\% = 7,5585\%$$

$$\text{Replikasi 3} = \frac{10,0229 - (51,1882 - 41,8814)}{10,0229} \times 100\% = 7,1426\%$$

Rerata kadar air pada produk teh hijau celup

$$= \frac{7,8587\% + 7,5585\% + 7,1424\%}{3} = 7,5199\%$$

$$\text{SD} = 0,3596$$

$$\%KV = 0,05\%$$

Lampiran 2**PERHITUNGAN V_{xo} UNTUK PENENTUAN LINIERITAS**

Kadar EGCG (ppm)	Area EGCG (mAU)
5,0400	53,90896
10,0800	103,44984
20,1600	209,41495
40,3200	440,50894
80,6400	941,64746
100,800	1204,01404
403,200	4550,29395
$Y = 11,313x + 4,8675$	
$r = 0,9998$	

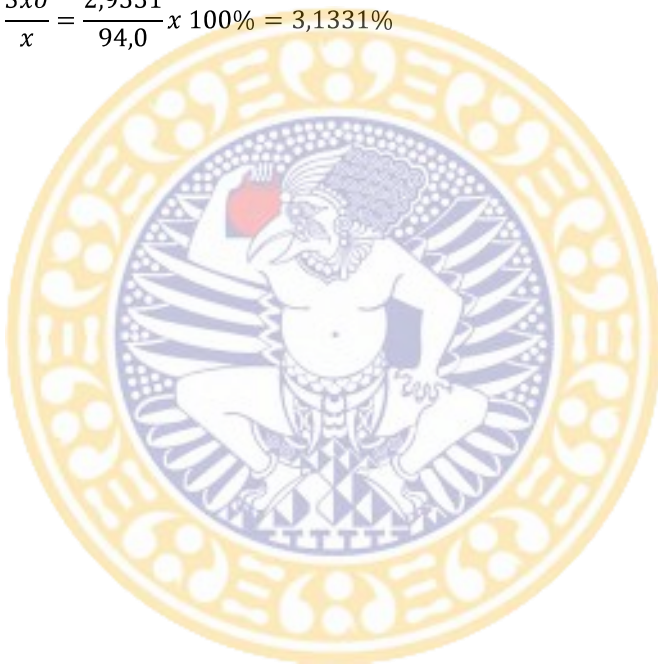
X_i	Y	Y_i	$(Y - Y_i)^2$
5,0400	53,90896	61,88354	63,6
10,0800	103,44984	118,90014	238,7
20,1600	209,41495	232,93335	553,1
40,3200	440,50894	460,99976	419,9
80,6400	941,64746	917,13258	601,0
100,800	1204,01404	1145,19899	3459,2
403,200	4550,29395	4566,195144	252,7
Rerata $x = 94,0$		$\Sigma(Y - Y_i)^2$	5588,2

$$S_y = \frac{5588,2}{7-2}$$

$$S_y = 33,43100$$

$$S_{xo} = \frac{s_y}{b} = \frac{33,43100}{11,313} = 2,9551$$

$$V_{xo} = \frac{S_{xo}}{x} = \frac{2,9551}{94,0} \times 100\% = 3,1331\%$$



Lampiran 3

PERHITUNGAN BATAS DETEKSI DAN BATAS KUANTITASI

Penentuan persamaan garis:

Konsentrasi (ppm)	Area (mAU)
1,5100	9,10432
2,5300	23,78789
5,0400	43,92984
6,0500	53,71515
8,0600	73,09016
10,0800	92,59032
$y = 9,4789x - 3,1920$	
$SD = 1,8537$	

Data perhitungan SD untuk membuat batas deteksi dan batas kuantitasi.

$$SD = 1,8537$$

Kemudian untuk menghitung nilai batas deteksi dan batas kuantitasi dipergunakan rumus berikut:

Batas Deteksi:

$$LOD = \frac{3,3}{Slope} \times SD$$

$$LOD = \frac{3,3}{9,4789} \times 1,8537$$

$$LOD = 0,5867 \text{ ppm}$$

Batas Kuantitasi:

$$LOQ = \frac{10}{Slope} \times SD$$

$$LOQ = \frac{10}{9,4789} \times 1,8537$$

$$LOQ = 1,9556 \text{ ppm}$$

Dari perhitungan tersebut diperoleh nilai batas deteksi = 0,5867 ppm

dan batas kuantitasi = 1,9556 ppm



Lampiran 4
PERHITUNGAN PRESISI ALAT

Replikasi	Area EGCG (mAU)
1	437,86566
2	434,26309
3	434,81082
4	434,00446
5	433,31778
6	431,69479
\bar{x}	434,32610
SD	2,040165
KV (%)	0,469731

Rerata area EGCG

$$= \frac{437,86566 + 434,26309 + 434,81082 + 434,00446 + 433,31778 + 434,32610}{6} = 434,32610$$

SD = 2,040165

$$\% \text{ KV} = \frac{2,040165}{434,32610} \times 100\% = 0,469731\%$$

Lampiran 5
CONTOH PERHITUNGAN PERSEN PEROLEHAN KEMBALI
(AKURASI) DAN PRESISI METODE

Standar EGCG ($\mu\text{g/ml}$)	Area (mAU)
40,04	483,73785
80,08	934,88947
100,10	1127,55188
400,40	4579,79004
500,50	5949,00879
Persamaan Regresi	$y = 11,757x - 21,255$

% Konsentrasi	Standar EGCG yang ditambahkan (mg)	Konsentrasi EGCG yang terdeteksi (mg)	% Recovery
80%	24,10	21,61	89,67
	24,20	24,85	102,68
	24,32	23,85	95,75
$\bar{X} \pm SD$			96,03 \pm 6,75
% KV			0,07
100%	30,22	24,48	81,03
	30,13	27,97	92,83
	30,07	25,90	86,34
$\bar{X} \pm SD$			86,73 \pm 5,84
% KV			0,07
120%	36,23	32,49	89,67
	36,10	34,87	96,59
	36,25	34,09	94,04
$\bar{X} \pm SD$			93,10 \pm 3,37
% KV			0,04

Replikasi I 80%

Standar 24,10 mg + ekstrak 500,40 mg \longrightarrow area = 1169,03796

Standar 24,10 mg + ekstrak 600,20 mg \longrightarrow area = 1212,20593

Standar 24,20 mg + ekstrak 700,70 mg \longrightarrow area = 1223,30640

Standar 24,10 mg + ekstrak 800,30 mg \longrightarrow area = 1236,80322

Standar 24,00 mg + ekstrak 900,50 mg \longrightarrow area = 1291,27637

Standar 24,10 mg + ekstrak 1000,70 mg \longrightarrow area = 1308,53540

Persamaan regresi adisi = $y = 269,6127x + 1037,4140$

Pada saat $x = 0$, maka $y = 1037,4140$ \longrightarrow substitusi ke persamaan regresi standar EGCG $y = 11,757x - 21,255$

$$y = 11,757x - 21,255$$

$$1037,4140 = 11,757x - 21,255$$

$X = 90,046 \text{ ppm} = 90,046 \text{ } \mu\text{g/ml}$ (Kadar dalam 25,0 ml etil asetat)

Kadar EGCG dalam 10,0 ml metanol

$$90,046 \text{ } \mu\text{g/ml} \times 10,0 \text{ ml} = 900,460 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 50,0 ml etil asetat

$$\frac{50,0 \text{ ml}}{25,0 \text{ ml}} \times 900,460 \mu\text{g} = 1800,917 \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 60,0 ml etil asetat (ekuivalen dengan 20,0 ml air)

$$\frac{60,0 \text{ ml}}{50,0 \text{ ml}} \times 1800,917 \mu\text{g} = 2161,1003 \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 25,0 ml air

$$\frac{25,0 \text{ ml}}{20,0 \text{ ml}} \times 2161,1003 \mu\text{g} = 2701,3754 \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 200,0 ml air

$$\frac{200,0 \text{ ml}}{25,0 \text{ ml}} \times 2701,3754 \mu\text{g} = 2161,1000 \mu\text{g} = 21,6100 \text{ mg}$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{0,021 \text{ g}}{0,024 \text{ g}} \times 100\% = 89,67\%$$

Replikasi II 80%

Standar 24,20 mg + ekstrak 500,40 mg → area = 1313,3000

Standar 24,40 mg + ekstrak 600,20 mg → area = 1361,12200

Standar 24,20 mg + ekstrak 700,70 mg → area = 1397,65000

Standar 24,00 mg + ekstrak 800,30 mg → area = 1413,09000

Standar 24,30 mg + ekstrak 900,50 mg → area = 1439,00366

Standar 24,10 mg + ekstrak 1000,70 mg → area = 1449,51208

Persamaan regresi adisi = $y = 265,7960x + 1196,1064$

Pada saat $x = 0$, maka $y = 1196,1064$ → substitusi ke

persamaan regresi standar EGCG $y = 11,757x - 21,255$

$$y = 11,757x - 21,255$$

$$1196,1064 = 11,757x - 21,255$$

$$X = 103,5435 \text{ ppm} = 103,5435 \text{ } \mu\text{g/ml (Kadar dalam 25,0 ml etil asetat)}$$

Kadar EGCG dalam 10,0 ml metanol

$$103,544 \text{ } \mu\text{g/ml} \times 10,0 \text{ ml} = 1035,435 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 50,0 ml etil asetat

$$\frac{50,0 \text{ ml}}{25,0 \text{ ml}} \times 1035,435 \text{ } \mu\text{g} = 2070,871 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 60,0 ml etil asetat (ekuivalen dengan 20,0 ml air)

$$\frac{60,0 \text{ ml}}{50,0 \text{ ml}} \times 2070,871 \text{ } \mu\text{g} = 2485,041 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 25,0 ml air

$$\frac{25,0 \text{ ml}}{20,0 \text{ ml}} \times 2485,041 \text{ } \mu\text{g} = 3106,3064 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 200,0 ml air

$$\frac{200,0 \text{ ml}}{25,0 \text{ ml}} \times 3106,3064 \text{ } \mu\text{g} = 24850,451 \text{ } \mu\text{g} = 24,850 \text{ mg}$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{0,0248 \text{ g}}{0,0242 \text{ g}} \times 100\% = 102,68 \%$$

Replikasi III %

Standar 24,30 mg + ekstrak 500,30 mg → area = 1285,84766

Standar 24,30 mg + ekstrak 600,20 mg → area = 1292,32983

Standar 24,20 mg + ekstrak 700,50 mg → area = 1388,96582

Standar 24,40 mg + ekstrak 800,60 mg → area = 1422,73706

Standar 24,30 mg + ekstrak 901,20 mg → area = 1430,09216

Standar 24,40 mg + ekstrak 1000,80 mg → area = 1436,07251

Persamaan regresi adisi = $y = 341,835x + 1119,426$

Pada saat $x = 0$, maka $y = 1119,426$ → substitusi ke persamaan regresi standar EGCG $y = 11,757x - 21,255$

$$y = 11,757x - 21,255$$

$$1119,426 = 11,757x - 21,255$$

$$X = 97,021 \text{ ppm} = 97,021 \text{ } \mu\text{g/ml (Kadar dalam 25,0 ml etil asetat)}$$

Kadar EGCG dalam 10,0 ml metanol

$$97,021 \text{ } \mu\text{g/ml} \times 10,0 \text{ ml} = 970,210 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 50,0 ml etil asetat

$$\frac{50,0 \text{ ml}}{25,0 \text{ ml}} \times 970,210 \text{ } \mu\text{g} = 1940,429 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 60,0 ml etil asetat (ekuivalen dengan 20,0 ml air)

$$\frac{60,0 \text{ ml}}{50,0 \text{ ml}} \times 1940,429 \mu\text{g} = 2328,514 \mu\text{g}$$

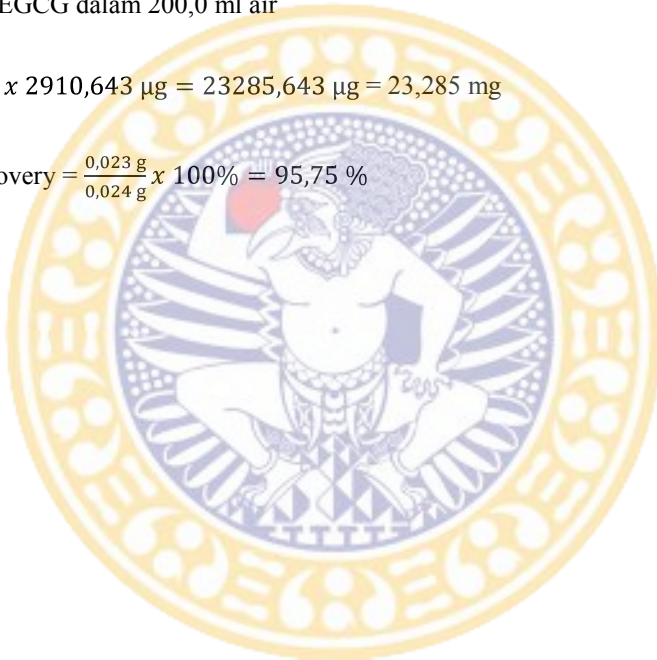
Kadar EGCG dalam 25,0 ml air

$$\frac{25,0 \text{ ml}}{20,0 \text{ ml}} \times 2328,514 \mu\text{g} = 2910,643 \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 200,0 ml air

$$\frac{200,0 \text{ ml}}{25,0 \text{ ml}} \times 2910,643 \mu\text{g} = 23285,643 \mu\text{g} = 23,285 \text{ mg}$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{0,023 \text{ g}}{0,024 \text{ g}} \times 100\% = 95,75 \%$$



Lampiran 6**CONTOH PERHITUNGAN KADAR EGCG DALAM PRODUK TEH
HIJAU CELUP PADA PENYEDUHAN 20 MENIT**

Standard EGCG ($\mu\text{g/ml}$)	Area (mAU)
5,04	132,07823
10,08	245,38634
20,16	367,50037
40,32	487,12347
100,80	611,95001
403,20	742,08380
Persamaan Regresi	$y = 11,313x + 4,8675$

Replikasi I

Standar 10,20 mg + ekstrak 2000,20 mg \longrightarrow area = 1672,48132

Standar 12,20 mg + ekstrak 2000,10 mg \longrightarrow area = 1861,38452

Standar 14,10 mg + ekstrak 2000,14 mg \longrightarrow area = 1894,10413

Standar 16,20 mg + ekstrak 2000,40 mg \longrightarrow area = 1985,07507

Standar 18,20 mg + ekstrak 2000,17 mg \longrightarrow area = 2170,09204

Persamaan regresi adisi = $y = 55,991x + 1122,700$

Pada saat $x = 0$, maka $y = 1122,700 \longrightarrow$ substitusi ke persamaan regresi

$$\text{standar EGCG } y = 11,313x + 4,8675$$

$$y = 11,313x + 4,8675$$

$$1122,700 = 11,313x + 4,8675$$

$$X = 98,809 \text{ ppm} = 98,809 \text{ } \mu\text{g/ml (Kadar dalam 25,0 ml etil asetat)}$$

Kadar EGCG dalam 10,0 ml metanol

$$98,809 \text{ } \mu\text{g/ml} \times 10,0 \text{ ml} = 988,090 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 50,0 ml etil asetat

$$\frac{50,0 \text{ ml}}{25,0 \text{ ml}} \times 988,090 \text{ } \mu\text{g} = 1976,191 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 60,0 ml etil asetat (ekuivalen dengan 20,0 ml air)

$$\frac{60,0 \text{ ml}}{50,0 \text{ ml}} \times 1976,191 \text{ } \mu\text{g} = 2371,429 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 25,0 ml air

$$\frac{25,0 \text{ ml}}{20,0 \text{ ml}} \times 2371,429 \text{ } \mu\text{g} = 2964,287 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 200,0 ml air

$$\frac{200,0 \text{ ml}}{25,0 \text{ ml}} \times 2964,287 \text{ } \mu\text{g} = 23714,287 \text{ } \mu\text{g} = 23,71 \text{ mg}$$

Berat air pada produk teh hijau celup = $7,5199\% \times 2007,6 \text{ mg} = 150,969 \text{ mg}$

Berat kering daun teh hijau = $2007,6 - 150,969 = 1856,631 \text{ mg}$

$$\% (b/b) = \frac{0,023 \text{ g}}{1,856 \text{ g}} \times 100\% = 1,28 \% (b/b)$$

Replikasi II

Standar 10,10 mg + ekstrak 2001,50 mg → area = 1664,39746

Standar 12,30 mg + ekstrak 2000,10 mg → area = 1781,71765

Standar 14,10 mg + ekstrak 2000,70 mg → area = 1809,43933

Standar 16,40 mg + ekstrak 2001,30 mg → area = 1891,73132

Standar 18,20 mg + ekstrak 2002,00 mg → area = 2070,36011

Persamaan regresi adisi = $y = 45,281x + 1199,600$

Pada saat $x = 0$, maka $y = 1199,600$ → substitusi ke persamaan regresi standar EGCG $y = 11,313x + 4,8675$

$$y = 11,313x + 4,8675$$

$$1199,600 = 11,313x + 4,8675$$

$X = 105,607 \text{ ppm} = 105,607 \text{ } \mu\text{g/ml}$ (Kadar dalam 25,0 ml etil asetat)

Kadar EGCG dalam 10,0 ml metanol

$$105,607 \text{ } \mu\text{g/ml} \times 10,0 \text{ ml} = 1056,070 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 50,0 ml etil asetat

$$\frac{50,0 \text{ ml}}{25,0 \text{ ml}} \times 1056,070 \text{ } \mu\text{g} = 2112,141 \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 60,0 ml etil asetat (ekuivalen dengan 20,0 ml air)

$$\frac{60,0 \text{ ml}}{50,0 \text{ ml}} \times 2112,14 \mu\text{g} = 2534,569 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 25,0 ml air

$$\frac{25,0 \text{ ml}}{20,0 \text{ ml}} \times 2534,569 \text{ } \mu\text{g} = 3168,211 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 200,0 ml air

$$\frac{200,0 \text{ ml}}{25,0 \text{ ml}} \times 3168,211 \text{ } \mu\text{g} = 25345,690 \text{ } \mu\text{g} = 25,346 \text{ mg}$$

Berat air pada produk teh hijau celup = $7,5199\% \times 2001,20 \text{ mg} = 150,969 \text{ mg}$

Berat kering daun teh hijau = $2001,20 - 150,490 = 1850,710 \text{ mg}$

$$\% \text{ (b/b)} = \frac{0,025 \text{ g}}{1,850 \text{ g}} \times 100\% = 1,37 \text{ } \% \text{ (b/b)}$$

Replikasi III

Standar 10,20 mg + ekstrak 2000,20 mg \longrightarrow area = 1683,78210

Standar 12,20 mg + ekstrak 2000,10 mg \longrightarrow area = 1791,52026

Standar 14,10 mg + ekstrak 2001,40 mg \longrightarrow area = 1825,27222

Standar 16,20 mg + ekstrak 2000,40 mg \longrightarrow area = 1880,28430

Standar 18,20 mg + ekstrak 2001,70 mg \longrightarrow area = 1921,42249

Persamaan regresi adisi = $y = 39,130x + 1285,600$

Pada saat $x = 0$, maka $y = 1199,600$ \longrightarrow substitusi ke persamaan regresi standar EGCG $y = 11,313x + 4,8675$

$$y = 11,313x + 4,8675$$

$$1285,600 = 11,313x + 4,8675$$

$$X = 113,209 \text{ ppm} = 113,209 \text{ } \mu\text{g/ml} \text{ (Kadar dalam 25,0 ml etil asetat)}$$

Kadar EGCG dalam 10,0 ml metanol

$$113,209 \text{ } \mu\text{g/ml} \times 10,0 \text{ ml} = \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 50,0 ml etil asetat

$$\frac{50,0 \text{ ml}}{25,0 \text{ ml}} \times 1132,090 \text{ } \mu\text{g} = 2264,178 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 60,0 ml etil asetat (ekuivalen dengan 20,0 ml air)

$$\frac{60,0 \text{ ml}}{50,0 \text{ ml}} \times 2264,178 \text{ } \mu\text{g} = 2717,014 \text{ } \mu\text{g}$$

Kadar EGCG dalam 25,0 ml air

$$\frac{25,0 \text{ ml}}{20,0 \text{ ml}} \times 2717,014 \text{ } \mu\text{g} = 3396,268 \text{ } \mu\text{g}$$

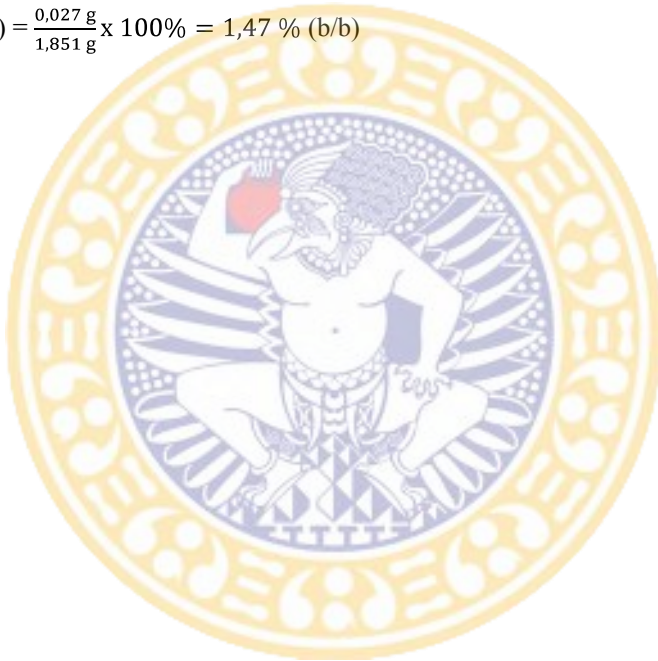
Kadar EGCG dalam 200,0 ml air

$$\frac{200,0 \text{ ml}}{25,0 \text{ ml}} \times 3396,268 \text{ } \mu\text{g} = 27170,140 \text{ } \mu\text{g} = 27,170 \text{ mg}$$

Berat air pada produk teh hijau celup = 7,5199% x 2001,80 mg = 150,533 mg

Berat kering daun teh hijau = 2001,80 – 150,533 = 1851,266 mg

$$\% \text{ (b/b)} = \frac{0,027 \text{ g}}{1,851 \text{ g}} \times 100\% = 1,47 \% \text{ (b/b)}$$



Lampiran 7
ANALISIS STATISTIKA

PRODUK TEH HIJAU CELUP**Oneway**

[DataSet0]

Descriptives								
Kadar								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Penyeduhan 20	3	1.3733	.09504	.05487	1.1372	1.6094	1.28	1.47
Penyeduhan 10	3	.9967	.13614	.07860	.6585	1.3349	.89	1.15
Penyeduhan 5.1	3	.6533	.25166	.14530	.0282	1.2785	.42	.92
Penyeduhan 5.2	3	.1533	.03512	.02028	.0661	.2406	.12	.19
Penyeduhan 5.3	3	.0633	.00577	.00333	.0490	.0777	.06	.07
Total	15	.6480	.52692	.13605	.3562	.9398	.06	1.47

ANOVA					
Kadar					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.703	4	.926	50.218	.000
Within Groups	.184	10	.018		
Total	3.887	14			

Post Hoc Tests

	(I) Penyeduhan	(J) Penyeduhan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Penyeduhan 20	Penyeduhan 10	.37667 [*]	.11086	.042	.0118	.7415
		Penyeduhan 5.1	.72000 [*]	.11086	.001	.3552	1.0848
		Penyeduhan 5.2	1.22000 [*]	.11086	.000	.8552	1.5848
		Penyeduhan 5.3	1.31000 [*]	.11086	.000	.9452	1.6748
	Penyeduhan 10	Penyeduhan 20	-.37667 [*]	.11086	.042	-.7415	-.0118
		Penyeduhan 5.1	.34333 [*]	.11086	.068	-.0215	.7082
		Penyeduhan 5.2	.84333 [*]	.11086	.000	.4785	1.2082
		Penyeduhan 5.3	.93333 [*]	.11086	.000	.5685	1.2982
	Penyeduhan 5.1	Penyeduhan 20	-.72000 [*]	.11086	.001	-1.0848	-.3552
		Penyeduhan 10	-.34333 [*]	.11086	.068	-.7082	.0215
		Penyeduhan 5.2	.50000 [*]	.11086	.008	.1352	.8648
		Penyeduhan 5.3	.59000 [*]	.11086	.002	.2252	.9548
	Penyeduhan 5.2	Penyeduhan 20	-1.22000 [*]	.11086	.000	-1.5848	-.8552
		Penyeduhan 10	-.84333 [*]	.11086	.000	-1.2082	-.4785
		Penyeduhan 5.1	-.50000 [*]	.11086	.008	-.8648	-.1352
		Penyeduhan 5.3	.09000 [*]	.11086	.921	-.2748	.4548
	Penyeduhan 5.3	Penyeduhan 20	-1.31000 [*]	.11086	.000	-1.6748	-.9452
		Penyeduhan 10	-.93333 [*]	.11086	.000	-1.2982	-.5685
		Penyeduhan 5.1	-.59000 [*]	.11086	.002	-.9548	-.2252
		Penyeduhan 5.2	-.09000 [*]	.11086	.921	-.4548	.2748
LSD	Penyeduhan 20	Penyeduhan 10	.37667 [*]	.11086	.007	.1297	.6237
		Penyeduhan 5.1	.72000 [*]	.11086	.000	.4730	.9670
		Penyeduhan 5.2	1.22000 [*]	.11086	.000	.9730	1.4670
		Penyeduhan 5.3	1.31000 [*]	.11086	.000	1.0630	1.5570
	Penyeduhan 10	Penyeduhan 20	-.37667 [*]	.11086	.007	-.6237	-.1297
		Penyeduhan 5.1	.34333 [*]	.11086	.011	.0963	.5903
		Penyeduhan 5.2	.84333 [*]	.11086	.000	.5963	1.0903
		Penyeduhan 5.3	.93333 [*]	.11086	.000	.6863	1.1803
	Penyeduhan 5.1	Penyeduhan 20	-.72000 [*]	.11086	.000	-.9670	-.4730
		Penyeduhan 10	-.34333 [*]	.11086	.011	-.5903	-.0963
		Penyeduhan 5.2	.50000 [*]	.11086	.001	.2530	.7470
		Penyeduhan 5.3	.59000 [*]	.11086	.000	.3430	.8370
	Penyeduhan 5.2	Penyeduhan 20	-1.22000 [*]	.11086	.000	-1.4670	-.9730
		Penyeduhan 10	-.84333 [*]	.11086	.000	-1.0903	-.5963
		Penyeduhan 5.1	-.50000 [*]	.11086	.001	-.7470	-.2530
		Penyeduhan 5.3	.09000 [*]	.11086	.436	-.1570	.3370
	Penyeduhan 5.3	Penyeduhan 20	-1.31000 [*]	.11086	.000	-1.5570	-1.0630
		Penyeduhan 10	-.93333 [*]	.11086	.000	-1.1803	-.6863
		Penyeduhan 5.1	-.59000 [*]	.11086	.000	-.8370	-.3430
		Penyeduhan 5.2	-.09000 [*]	.11086	.436	-.3370	.1570

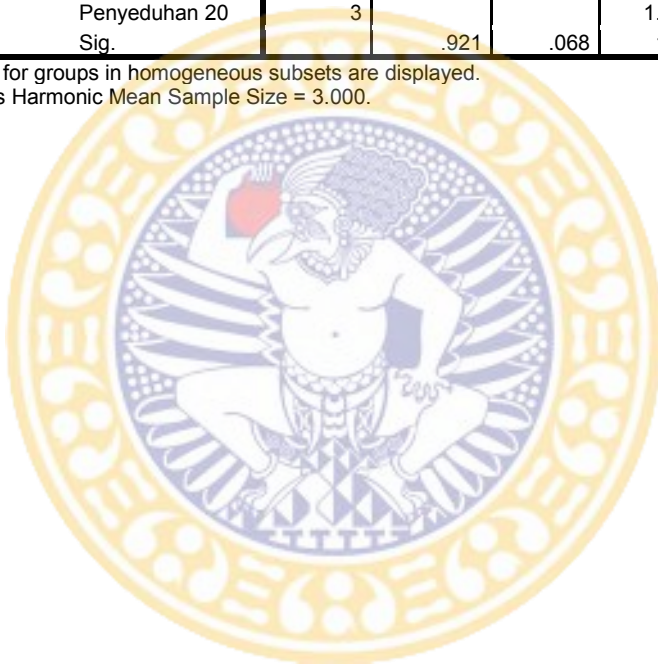
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

Kadar					
	Penyeduhan	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Tukey HSD ^a	Penyeduhan 5.3	3	.0633		
	Penyeduhan 5.2	3	.1533		
	Penyeduhan 5.1	3		.6533	
	Penyeduhan 10	3		.9967	
	Penyeduhan 20	3			1.3733
	Sig.		.921	.068	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



Lampiran 8

KROMATOGRAM PELARUT METANOL

Injection Date : 7/14/2016 9:12:28 AM
 Sample Name : metanol Location : Vial :
 Acq. Operator : CANRA Inj Volume : 10 ul
 Acq. Method : C:\HPCHEM\3\METHODS\CANRA.M\CANRASQ.M
 Last changed : 7/13/2016 12:14:56 PM by CANRA
 Analysis Method : C:\HPCHEM\3\METHODS\CANRA.M
 Last changed : 9/1/2016 2:07:16 PM by NIA
 (modified after loading)



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with STATUS

Signal 1: DAD1 A, Sig=274.8 Ref=off
 Results obtained with enhanced integrator:

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol.	Select ivity
3.344	-	5.69281	3.35372e-1	0.10	0.4622	290	-	-

*** End of Report ***

Lampiran 9

KROMATOGRAM STANDAR EGCG

Injection Date : 8/10/2016 1:34:29 PM Seq. Line : 1
 Sample Name : 40ppm Location : Vial 4
 Acq. Operator : canra Inj : 3
 Inj Volume : 10 µl
 Acq. Method : C:\BPCHEM\3\METHODS\CANRA.M
 Last changed : 6/30/2016 1:06:07 PM by canra
 Analysis Method : C:\BPCHEM\3\METHODS\CANRA.M
 Last changed : 7/21/2016 4:49:19 PM by CANRA
 (modified after loading)



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=274,8 Ref=off
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol.	Select
								ivity
3.319	-	15.22443	5.63828e-1	0.51	0.4733	272	-	-
8.988	-	440.50894	5.25822	0.48	1.1667	329	4.06	2.71

*** End of Report ***

Lampiran 10

KROMATOGRAM SAMPEL PRODUK TEH HIJAU CELUP

```

Injection Date : 8/9/2016 5:14:29 PM      Seq. Line : 22
Sample Name    : Hijau                    Location  : Vial 26
Acq. Operator  : RATHIE                   Inj       : 1
                                                Inj Volume: 10 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\3\METHODS\CANRA.M
Last changed   : 8/9/2016 5:00:10 PM by RATHIE
                                                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\3\METHODS\CANRA.M
Last changed   : 8/9/2016 10:23:24 PM by MIA
                                                (modified after loading)

```



Area Percent Report With Performance

```

Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

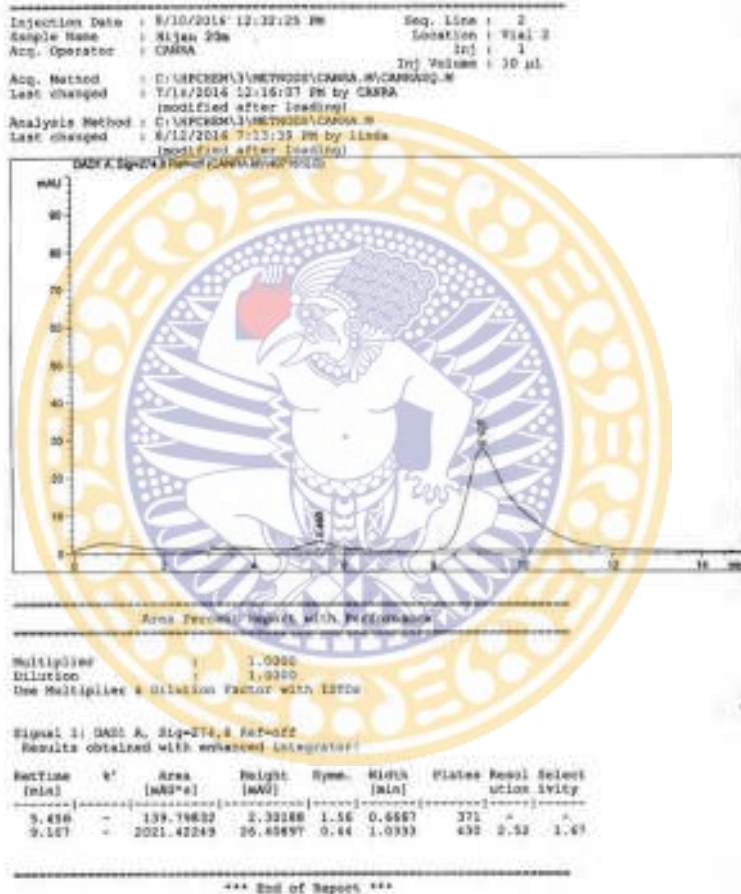
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=274.8 Ref=off
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select tion	ivity
2.121	-	81.79195	1.07742	0.94	1.3267	14	-	-	-
3.299	-	62.97168	1.00460	0.30	0.9367	69	0.61	1.56	-
5.464	-	56.04483	7.43336e-1	0.70	1.0667	145	1.27	1.66	-
9.006	-	820.15485	10.21117	0.63	0.9800	468	2.03	1.65	-

*** End of Report ***

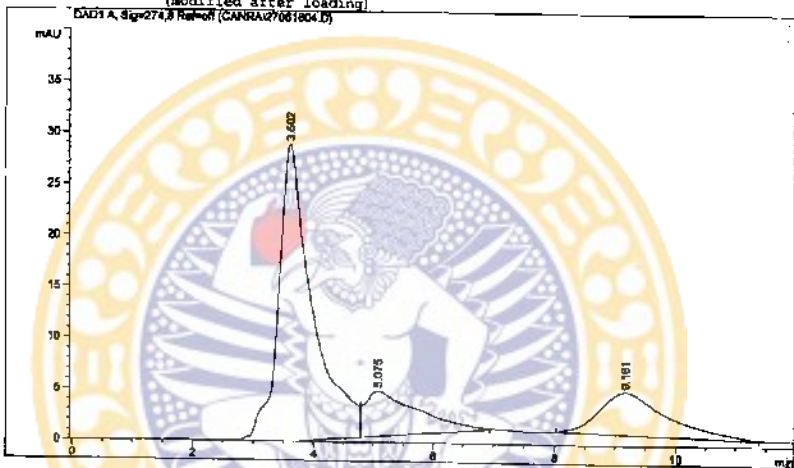
Lampiran 11

KROMATOGRAM SAMPEL PRODUK TEH HIJAU CELUP YANG
DIADISI STANDAR EGCG

Lampiran 12

KROMATOGRAM SAMPEL PRODUK TEH HITAM CELUP

Injection Date : 6/27/2016 7:35:16 PM Seq. Line : 5
 Sample Name : R HITAM Location : Vial 5
 Acq. Operator : CANRA Inj : 1
 Inj Volume : 10 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\3\METHODS\CANRA.M
 Last changed : 6/27/2016 5:20:30 PM by nurul
 Analysis Method : C:\HPCHEM\3\METHODS\CANRA.M\CANRASQ.M
 Last changed : 6/27/2016 7:36:26 PM by nurul
 (modified after loading)



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DATA A, Sig=274.8 Ref=off
 Results obtained with enhanced integrator!

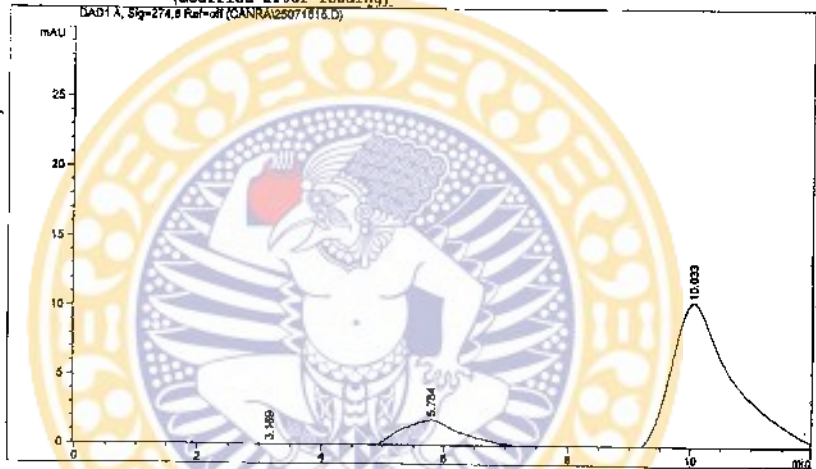
RetTime [min]	X'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
3.602	-	1148.01001	28.00493	0.53	0.5033	284	-	-
5.075	-	274.57767	4.43411	0.29	1.1333	107	1.05	1.41
9.161	-	325.53818	4.14250	0.59	1.1000	354	2.13	1.81

*** End of Report ***

Lampiran 13

KROMATOGRAM SAMPEL PRODUK TEH HITAM CELUP YANG
DIADISI STANDAR EGCG

Injection Data : 8/10/2016 6:21:40 PM Seq. Line : 2
 Sample Name : Hitam 20 menit Location : Vial 5
 Acq. Operator : CANRA Inj : 1
 Inj Volume : 10 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\3\METHODS\CANRA.M
 Last changed : 7/15/2016 4:46:37 PM by CANRA
 Analysis Method : C:\HPCHEM\3\METHODS\CANRA.M
 Last changed : 7/27/2016 12:57:50 PM by MIA
 (modified after loading)



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1'A, Sig=274.8 Ref-off
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ivity
3.169	-	25.24836	1.01386	0.18	0.5767	167	-	-
5.784	-	364.31601	2.97479	0.63	1.6867	65	1.36	1.83
10.033	-	913.48737	11.41755	0.52	1.1067	455	1.79	1.73

*** End of Report ***